

Implicación de p38 γ y p38 δ MAPKs en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.

Paloma del Reino Fernández
Tesis doctoral

Dpto. de Biología Molecular - Universidad Autónoma de Madrid.
Dpto. de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología-CSIC.
Madrid, Julio 2012

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS.....	15
ABSTRACT.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
1. El colon: Estructura y homeostasis.....	25
1.1. Estructura del colon.....	25
1.2. Homeostasis del colon.....	26
2. Patologías asociadas a inflamación habituales en el colon.....	28
2.1. Inflamación en el colon: colitis ulcerosa.....	28
2.1.1. Desregulación de la barrera intestinal.....	29
2.1.2. Sistema inmune innato y adaptativo en el colon.....	29
2.2. Cáncer de colon.....	31
2.2.1. Ruta Wnt/ β -catenina.....	32
2.2.2. Ruta canónica K-Ras/Raf/MAPK.....	33
2.2.3. Metaloproteinasas de matriz (MMPs).....	34
2.3. Conexión entre inflamación y cáncer.....	36
2.3.1. Células inflamatorias: macrófagos, neutrófilos y linfocitos.....	37
2.3.2. Moléculas que conectan inflamación y cáncer: citoquinas, STAT3, COX2 y NF- κ B.....	39
3. Familia de las MAPKs.....	44
3.1. p38MAPKs.....	46
3.1.1. Identificación: isoformas.....	46
3.1.2. Activación.....	46
3.1.3. Sustratos y funciones.....	47
3.1.4. Papel de las p38MAPKs en patologías.....	48
4. Modelos de CU y CAC en ratones.....	49
4.1. Modelo de CU.....	49
4.2. Modelo de CAC.....	50
OBJETIVOS.....	53

MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. Tampones y reactivos.....	59
1.1. Tampones.....	59
1.2. Reactivos.....	59
2. Ratones.....	60
3. Tratamientos realizados con ratones.....	60
3.1. Modelo de colitis ulcerosa (CU) en ratones	60
3.2. Modelo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) en ratones.....	61
3.3. Valoración y seguimiento de los tratamientos.....	61
4. Procesamiento histológico de las muestras de colon.....	61
4.1. Embebido en parafina de las muestras de colon.....	61
4.2. Tinciones histológicas.....	62
4.2.1. Contrastes con H&E.....	62
4.2.2. Histoinmunofluorescencias.....	62
5. Obtención de proteínas y RNA a partir de tejido de colon.....	63
5.1. Obtención de proteínas.....	63
5.2. Aislamiento de RNA total.....	63
6. Disgregación de colon.....	64
6.1. Obtención de criptas.....	64
6.2. Fraccionamiento celular tipo <i>Kelmer</i>	64
7. Inmunoprecipitación de proteínas.....	65
8. Análisis de proteínas por electroforesis e inmunodetección (<i>Western blot</i>).....	66
8.1. Electroforesis.....	66
8.2. Transferencia e inmunodetección (<i>Western blot</i>).....	67
9. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	67
9.1. Síntesis de cDNA.....	67
9.2. PCR cuantitativa.....	67
10. Medida de los niveles de citoquinas por Luminex®.....	69
10.1. Cultivo de tejidos de colon.....	69
10.2. Luminex®.....	69
11. Detección de células apoptóticas por la técnica de TUNEL.....	69
12. Análisis estadístico.....	70
RESULTADOS.....	71

1. Cáncer de colon asociado a colitis ulcerosa.....	73
1.1. Efectos del tratamiento con AOM /DSS.....	73
1.1.1. Supervivencia, variación de peso y de la longitud del colon.....	73
1.1.2. Aparición de tumores.....	75
1.1.3. Aparición de úlceras.....	77
1.2. Procesos celulares que contribuyen a la aparición y desarrollo tumoral.....	79
1.2.1. Proliferación celular.....	80
1.2.2. Apoptosis.....	81
1.3. Estado de las MAPKs.....	83
1.3.1. Niveles de expresión y activación de p38MAPKs.....	83
1.3.2. Otras proteínas MAPKs: ERK1/2 y JNK1/2.	85
1.4. Expresión de moléculas y células implicadas en CAC.....	85
1.4.1. Proteínas relacionadas con CAC.....	86
β-catenina.....	86
STAT3.....	87
COX2.....	87
MMP9.....	88
1.4.2. Niveles de mRNA de citoquinas relacionadas con CAC.....	90
1.4.3. Células inmunes implicadas en CAC.....	91
Macrófagos.....	91
Neutrófilos.....	93
Linfocitos.....	94
2. Colitis ulcerosa.....	96
2.1. Efectos del tratamiento con DSS.....	96
2.1.1. Variación de peso y de la longitud del colon.....	96
2.1.2. Valoración del daño epitelial y de la inflamación de la mucosa.....	97
2.1.3. Aparición de úlceras.....	99
2.2. Estado de diferentes vías de señalización.....	101
2.2.1. MAPKs.....	101
2.2.2. NF-κB.....	103
2.2.3. β-catenina/GSK3.....	104
2.3. Moléculas mediadoras en la inflamación intestinal.....	105
2.3.1. STAT3.....	105
2.3.2. COX2.....	107
2.3.3. MMP9.....	107

2.3.4. Niveles de citoquinas.....	108
2.4. Células implicadas en inflamación.....	110
2.4.1. Macrófagos.....	110
2.4.2. Neutrófilos.....	112
2.4.3. Linfocitos.....	114
DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla M-1. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante “western-blot” (WB) e histoinmunofluorescencia (HI).....	66
---	----

Tabla M-2. Oligonucleótidos utilizados para valorar los niveles de mRNA mediante qRT-PCR.....	68
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. I-1. Esquema de la estructura de la pared del colon.....	26
--	----

Fig. I-2. Proceso de diferenciación de células progenitoras en las criptas del colon.....	27
--	----

Fig. I-3. Células participantes en la respuesta inmune en la mucosa intestinal.....	30
--	----

Fig. I-4. Esquema de la relación descrita entre las alteraciones genéticas y la progresión del cáncer de colon.....	32
--	----

Fig. I-5. Mecanismo de la aparición de la inestabilidad a nivel de las secuencias microsatélites del DNA.....	32
--	----

Fig. I-6. Ruta canónica de señalización Wnt/ β -catenina.....	33
--	----

Fig. I-7. Ruta canónica Ras/Raf/MAPK.....	34
--	----

Fig. I-8. Producción de MMPs en el intestino durante la inflamación de la mucosa.....	35
--	----

Fig. I-9. Rutas de conexión entre inflamación y cáncer.....	36
--	----

Fig. I-10. Efecto de diferentes citoquinas en la progresión tumoral.....	40
---	----

Fig. I-11. Rutas de señalización canónica y alternativa de NF- κ B y de STAT3.....	42
--	----

Fig. I-12. Cascada de señalización de las MAPKs.....	45
---	----

Fig. I-13. Funciones fisiológicas e implicaciones patológicas de las rutas de señalización de las p38MAPKs.....	49
--	----

Fig. I-14. Mecanismos de acción del AOM y rutas que se ven comprometidas por su acción mutagénica.....	51
---	----

Fig. M-1. Esquemas de la línea del tiempo de los modelos de CU y CAC en ratones.....	61
---	----

Fig. M-2. Control del fraccionamiento celular mediante WB.....	65
---	----

Fig. R-1. Efectos del tratamiento con AOM/DSS sobre la supervivencia, la variación de peso y la longitud del colon en ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$	74
--	----

Fig. R-2. Los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan mayor número de tumores que los ratones wt y p38 $\gamma^{-/-}$ tras el tratamiento con AOM/DSS.....	75
Fig. R-3. Los ratones carentes en p38 $\delta^{-/-}$ no desarrollan úlceras tras el tratamiento con AOM/DSS.....	78
Fig. R-4. Proliferación de células de la mucosa intestinal tras el tratamiento con AOM/DSS.....	80
Fig. R-5. Los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un mayor grado de apoptosis que los ratones wt tras el tratamiento con DSS.....	82
Fig. R-6. Niveles de expresión de mRNA de p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ , así como niveles de proteína y de activación de las p38MAPKs tras el tratamiento con AOM/DSS.....	84
Fig. R-7. Niveles de expresión y de activación de JKN1/2 y ERK1/2 analizados en ratones tratados con AOM/DSS.....	85
Fig. R-8. Análisis de los niveles de mRNA y de expresión de la proteína β -catenina tras el tratamiento con AOM/DSS.....	86
Fig. R-9. Niveles de expresión y fosforilación de STAT3 tras el tratamiento con AOM/DSS.....	87
Fig. R-10. Estudio de la expresión de COX2 en el colon de ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento o no con AOM/DSS.....	88
Fig. R-11. Análisis de la expresión de los niveles de mRNA y de proteína MMP9, expresada en el tejido de colon, con y sin tratamiento con AOM/DSS.....	89
Fig. R-12. Niveles de expresión de mRNA de citoquinas pro- y anti-inflamatorias tras el tratamiento con AOM/DSS.....	90
Fig. R-13. Infiltración de macrófagos en el tejido de colon.....	92
Fig. R-14. Infiltración de neutrófilos en el tejido de colon.....	93
Fig. R-15. Infiltración de linfocitos en el tejido de colon.....	95
Fig. R-16. Seguimiento en la variación del peso y de la longitud del colon, a lo largo del tratamiento con DSS y posterior recuperación, en ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$	96
Fig. R-17. Valoración histopatológica del grado de daño epitelial y el grado de inflamación de la mucosa intestinal tras el tratamiento con DSS.....	98
Fig. R-18. Cuantificación de las úlceras encontradas en el colon de los ratones tratados con DSS.....	100
Fig. R-19. Niveles de proteína y activación de las p38MAPKs tras el tratamiento con DSS.....	101

Fig. R-20. Niveles de proteína y activación de ERK1/2 y JNK1/2 tras el tratamiento con DSS.....	102
Fig. R-21. Estudio de la vía de señalización de NF- κ B en el colon de ratones tratados con DSS.....	103
Fig. R-22. Análisis de la vía de señalización de β -catenina en el colon de animales tratados con DSS.....	105
Fig. R-23. Análisis del estado de fosforilación y de los niveles de proteína STAT3 en el colon de ratones tratados con DSS.....	106
Fig. R-24. Expresión de mRNA de COX2 en ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del tratamiento con DSS.....	107
Fig. R-25. Expresión de mRNA de MMP9 en ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del tratamiento con DSS.....	108
Fig. R-26. Niveles de expresión de mRNA y niveles de secreción de citoquinas en ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS.....	109
Fig. R-27. Infiltración de macrófagos en el colon tras el tratamiento con DSS.....	111
Fig. R-28. Infiltración de neutrófilos en el colon tras el tratamiento con DSS.....	113
Fig. R-29. Infiltración de linfocitos en el colon tras el tratamiento con DSS.....	114
Fig. D-1. Niveles de proteína Tpl2 tras el tratamiento con DSS.....	128
Fig. D-2. Modelo de la producción de moléculas y del estado de procesos implicados en inflamación y tumorigénesis en ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\delta^{-/-}$	129

ABREVIATURAS

A: Adenina.

AP-1: Activator Protein-1.

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

ASK1: Apoptosis Signal-regulated Kinase 1.

ATF2: Activator Transcription Factor 2.

BSA: Bovine Serum Albumin.

C: Citosina.

CAC: Cáncer de colon Asociado a Colitis.

CD: Cluster of Differentiation.

CK1 α : Casein Kinase I α .

COX2: Cyclooxygenase 2.

CU: Colitis Ulcerosa.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DNA: Deoxyribonucleic Acid.

DSTT: Division of Signal Transduction Therapy (Dundee, UK).

DTT: Dithiothreitol.

Dvl: Dishevelled.

ECL: Enhanced Chemiluminescence detection system.

EDTA: Ethylenediaminetetracetic Acid.

EGF: Epidermal Growth Factor.

EGTA: Ethylenglycoltetracetic Acid.

ERK1/2: Extracellular signal-regulated Kinase 1/2.

ERK5: Extracellular signal-regulated Kinase 5.

F4/80: Cell surface glycoprotein F4/80.

FasL: Fas Ligand.

G: Guanina.

GAPs: GTPase Activating Proteins.

GDP: Guanosine Diphosphate.

GEFs: Guanine nucleotide Exchange Factors.

Gly: Glycine.

Gr1: Granulocyte-differentiation antigen 1.

GSK3 α/β : Glycogen Synthase Kinase 3 α/β .

GTP: Guanosine Triphosphate.

H&E: Hematoxilina y Eosina.

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution.

HIF-1 α : Hipoxia Inducible Factor 1 α .

HRP: Horseradish Peroxidase.

IFN γ : Interferon γ .

IH: Immunohistofluorescencia.

IKKs: Inhibitory κ B Kinases.

IL: Interleuquina.

iNOS: Induced Nitric Oxide Synthase.

I κ B α : Inhibitor NF κ B α .

JAK1: Janus Kinase 1.

JNKs: c-Jun NH2-terminal Kinases.

kDa: Kilodalton.

Lef: Lymphocyte Enhancer Factor.

LPS: Lipopolysaccharide.

LRP5/6: Low-Density-Lipoprotein-Related Protein 5/6.

MAP3K: MAP Kinase Kinase Kinase.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MAPKAP-K2/3: MAPK-Activated Protein kinase-2/3.

MEK/MKK: MAPK/Extracelular signal-regulated Kinase (ERK)-Kinase.

MHC: Major Histocompatibility Complex.

MMPs: Matrix Metalloproteinases.

MMR: Mismatch Repair.

MNKs: MAP kinase signal-integrating Kinases.

mRNA: Messenger Ribonucleic Acid.

MSI-H: Microsatellite Inestability-High.

MSK1/2: Mitogen and Stress activated Kinases 1/2.

MUC2: Mucin 2.

MyoD: Myogenic Differentiation 1.

NF κ B: Nuclear Factor κ B.

NLRs: Nucleotide oligomerization domain (NOD) Like Receptors.

Notch1: Neurogenic locus notch homolog protein 1.

p38MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase p38.

p53: Tumor suppressor p53.

PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerase.

PBS: Phosphate-Buffered Saline.

pCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen.

PDGE: Platelet-Derived Growth Factor.

PKD1: Protein Kinase D1.

PE: Phycoerythrin.

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase.

PIAS: Protein Inhibitor of Activated STAT.

PKB: Protein Kinase B.

PRRs: Pattern-Recognition Receptors.

qRT-PCR: Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction.

Rsk1-4: Ribosomal s6 Kinase 1-4.

SAP90/PSD95: Synapsis Associated Protein 90/Post Synaptic Density protein 95.

SAP97/hDlg: Synapse Associated Protein 97/Human Discs Large homolog 1.

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

Ser: Serine.

SGK: Serine/threonine-protein kinase.

siRNA: Small Interfering RNA.

SOCS: Suppressor of Cytokine Signalling.

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3.

T: Timidina.

TAK1: TGF β Activated Kinase 1.

Tau: Microtubule-associated protein Tau.

Tcf: T cell factor.

TGF β -RII: Transforming Growth Factor β -Receptor II.

TGF β : Transforming Growth Factor β .

Thr: Threonine.

TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases.

TLRs: Toll-Like Receptors.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

TUNEL: TdT-mediated dUTP Nick End Labelling.

Tyr: Tyrosine.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

WB: Western Blot.

WT: Wild-type.

ABSTRACT

Colon cancer associated with colitis (CAC) is a subtype of colorectal cancer in which inflammatory and tumorigenic processes converge and is associated with inflammatory bowel disease, such as occurring in ulcerative colitis (UC). To elucidate the factors involved in tumor onset and development, we must analyze immunological and genetic factors.

The p38MAPK (mitogen-activated protein kinases) signaling pathway links extracellular signaling to mechanisms that control fundamental cell processes such as growth, proliferation, differentiation, migration, and apoptosis. The p38MAPK family is formed by four members, p38 α , p38 β , p38 γ and p38 δ . p38 α regulates inflammation and malignant transformation, but little is known about the functions of the other p38MAPK isoforms in these processes.

The main objective of this thesis was to define the implication of p38 γ and p38 δ in murine models of CAC and UC. For this purpose, we studied the phenotype of wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ mice treated with AOM/DSS (azoxymethane/dextran sodium sulfate, for the CAC model) or DSS (for the UC model).

Histopathological examination of colon sections from AOM/DSS-treated mice showed larger, more numerous tumors in p38 $\delta^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ than in wt and p38 $\gamma^{-/-}$ mice. Analysis of intestinal mucosa showed increased epithelial cell proliferation in p38 $\delta^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ compared to wt mice, as well as lower numbers of apoptotic cells in p38 $\delta^{-/-}$ than in p38 $\gamma^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ mice. Increase in MMP9 levels, which are generally implicated in CAC, were higher in treated p38 $\delta^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ mice than in the other genotypes. These results indicated that p38 δ is implicated in tumor development, regulating processes such as proliferation and apoptosis, and altering levels of protumor proteins such as MMP9.

We studied tissue damage and inflammation in hematoxylin/eosin-stained histological sections from the four mouse genotypes after DSS treatment. p38 $\gamma^{-/-}$ mice had the highest degree of inflammation compared with the other genotypes. Analysis of intestinal mucosa showed increased epithelial cell apoptosis in p38 $\gamma^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ compared to wt mice. Immunofluorescence studies of histological sections showed higher levels of macrophage infiltration in treated p38 $\gamma^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ than in the other genotypes and less neutrophils infiltration in treated p38 $\delta^{-/-}$ and p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ mice in both models (CAC and UC). COX2 protein and mRNA levels, which are linked to inflammatory processes, were higher in treated p38 $\gamma^{-/-}$ mice than in the other genotypes in CAC model. In DSS-treated p38 $\gamma^{-/-}$ mice, pro-inflammatory cytokine levels (IL1 β , IL6 and TNF α) were higher than in treated wt mice. These findings implicate p38 γ in inflammatory processes such as apoptosis, pro-inflammatory cytokine production and in regulating inflammatory molecules like COX2.

The results indicate that although both p38MAPK isoforms are involved in the alterations found in CAC and UC models, the main isoform involved in tumor development is p38 δ , whereas p38 γ is involved in inflammatory processes.

INTRODUCCIÓN

1. El colon: estructura y homeostasis.

El colon es el último tramo del tubo digestivo, comprendido entre el final del intestino delgado y el ano. En el ser humano, tiene una longitud aproximada de 1,5 metros (Sobotta, 2010). Aunque su función principal es el transporte de las heces y su almacenamiento temporal, también desempeña una importante función en: la absorción de nutrientes; el mantenimiento del equilibrio entre la cantidad de agua absorbida y la secretada; la generación de tolerancia inmunitaria ante elementos de la comida no tóxicos y el control de la respuesta inmune ante agresiones de sustancias patógenas (Schoultz *et al.*, 2011).

1.1. Estructura del colon.

La pared del colon puede dividirse en cuatro capas (Sobotta, 2010) (Fig. I-1):

- La mucosa: es la capa que está en contacto con el lumen o luz del colon. No presenta vellosidades como en el intestino delgado, sino que posee una superficie relativamente lisa que se caracteriza por la presencia de profundas criptas, llegando a alcanzar la capa muscular, muy próximas entre si. La mucosa, a su vez, puede dividirse en tres capas:
 - El epitelio que está formado por una capa celular mono-estratificada en la que se pueden encontrar: células absortivas o enterocitos, encargados de la re-absorción de agua; células caliciformes, responsables de la secreción de moco; células enteroendocrinas, implicadas en la secreción de hormonas; células progenitoras, a partir de las cuales se generan el resto de tipos celulares y células cilíndricas altas, características del epitelio simple.
 - La lámina propia está constituida por tejido reticular y en ella se pueden encontrar abundantes macrófagos, plasmocitos, eosinófilos, linfocitos y mastocitos.
 - La muscular propia de la mucosa es una capa muy fina de tejido muscular liso, compuesto a su vez por dos capas: una capa interna circular y una capa externa longitudinal.
- La submucosa: compuesta por tejido conjuntivo laxo en el cual podemos encontrar frecuentemente adipocitos.
- La capa muscular: está constituida por tejido muscular liso dispuesto en dos capas: una interna circular y continua y otra externa longitudinal y discontinua. La capa muscular está dispuesta en cordones denominados tenias.
- La serosa o adventicia: es la capa más externa, compuesta por tejido conjuntivo y mesotélico.

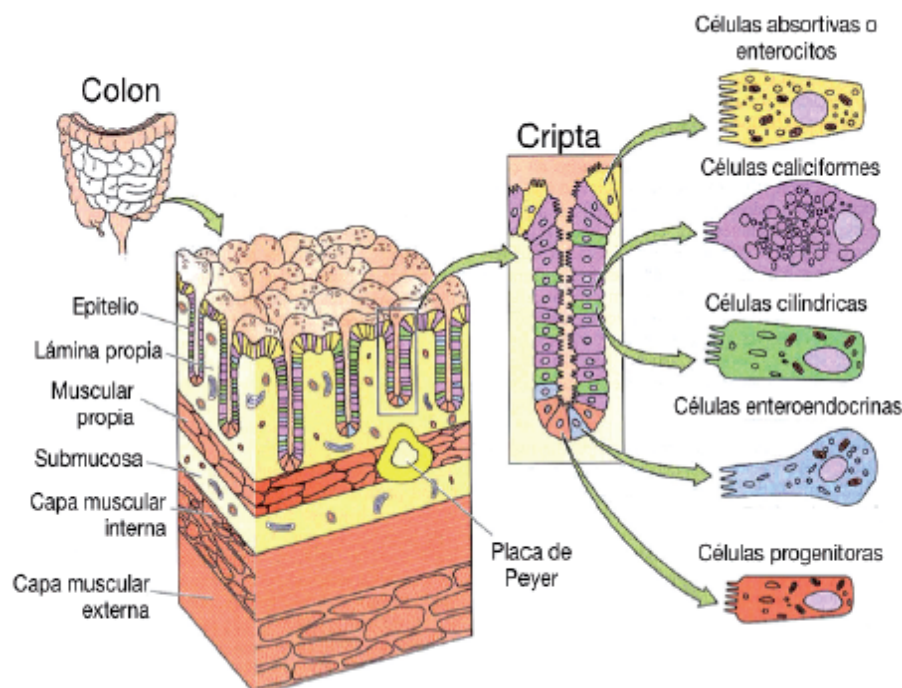


Fig. I-1. Esquema de la estructura de la pared del colon. (Figura adaptada del Dr. L.F. Pacheco B.)

1.2. Homeostasis del colon.

En el colon, de modo habitual, hay alrededor de 500 especies de bacterias, que están en simbiosis con el hospedador, formando parte de la flora intestinal (Bene *et al.*, 2011). La presencia de estas bacterias provoca que haya una constante regulación de la homeostasis intestinal, mediada por el sistema inmune localizado en la pared del colon, generando un estado de tolerancia inmunitaria a las bacterias simbiotes (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). La función de barrera que desempeña la mucosa intestinal, viene definida por la capacidad que tiene el epitelio intestinal para identificar elementos extraños presentes en el lumen (potencialmente tóxicos, incluyendo nutrientes y microbios), mediante una intensa regulación interna del medio (Baumgart & Dignass, 2002).

Este sistema defensivo presenta tres niveles: (i) un nivel pre-epitelial, constituido por moco secretado por las células caliciformes; (ii) un segundo nivel formado por las células epiteliales, que regulan la permeabilidad de la mucosa; y (iii) un tercer nivel post-epitelial, compuesto por la lámina propia, donde se localizan la mayoría de las células que forman parte del sistema inmunitario de la mucosa (Dignass *et al.*, 2004).

El moco está formado por mucina, una glicoproteína que se asocia a lípidos y a otras proteínas, formando una capa continua que recubre las paredes del colon (Sturm & Dignass, 2008). Este moco se organiza en dos capas: una interna, en contacto con el epitelio de la mucosa y que no presenta bacterias y, otra externa, que si incluye bacterias (Johansson *et al.*, 2008). Una incorrecta interacción entre la flora bacteriana y la mucosa puede conllevar la activación de la respuesta inmune. Se ha observado que la falta o desequilibrio en la población bacteriana simbiote genera enfermedades inflamatorias (Bene *et al.*, 2011; Danese *et al.*, 2004). En el mantenimiento de este equilibrio, juegan un papel muy importante las defensinas, que son unos péptidos antimicrobianos secretados por varios tipos celulares del tracto intestinal. Estos péptidos forman parte de la inmunidad innata del hospedador, participando en la protección del epitelio frente a patógenos virulentos, así como en mantener el número y la composición de la flora intestinal (Johansson *et al.*, 2008).

En el colon también hay una constante renovación celular a nivel del epitelio, desde el fondo de las criptas, donde están situadas las células progenitoras, hasta la parte superior de las mismas, donde se produce la apoptosis de células totalmente diferenciadas (Fig. 1-2).

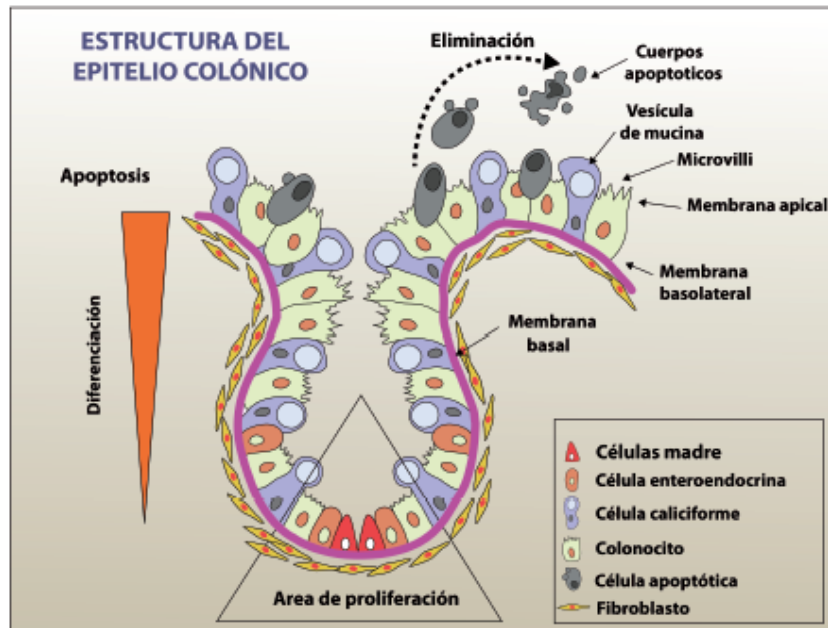


Fig. 1-2. Proceso de diferenciación y proliferación de células progenitoras en las criptas del colon. Las células progenitoras, situadas en el fondo de la cripta, proliferan y se van a ir diferenciando a la vez que se desplazan hacia la parte superior de la cripta, donde mueren por apoptosis. (Figura adaptada de Juan Ignacio Barrasa López).

Este proceso de renovación se da sin que se rompa la integridad de las uniones célula-célula, factor muy importante para mantener la correcta homeostasis del sistema inmune del colon (Garrett *et al.*, 2010). Aunque este epitelio no es totalmente impermeable, sino que hay un tránsito de sustancias a través de él. De modo habitual, las sustancias pueden atravesar el epitelio de tres modos: (i) mediante micropliegues, como los que pueden formar las placas de Peyer; (ii) mediante una ruta paracelular en los enterocitos o (iii) mediante un transporte trans-epitelial, por endocitosis realizada por los enterocitos (Schultz *et al.*, 2011).

Por otro lado, en el intestino sano se debe mantener un equilibrio entre factores que activen la inmunidad del huésped (como daños del epitelio, agresiones procedentes de restos de la comida, ataques de patógenos, etc.) y factores que formen parte de las defensas de éste, para mantener la integridad de la mucosa y la respuesta inmune bajo control (Ramasundara *et al.*, 2009). La respuesta inmune del colon sano está compuesta por una respuesta innata, que es la primera en activarse de modo muy rápido, desarrollándose en horas, y por una respuesta adaptativa, cuando el antígeno que desencadenó la respuesta innata persiste, dando lugar a procesos inmunes más sostenidos, que duran varios días (Dignass *et al.*, 2004).

Para la correcta homeostasis del colon, también hay que tener en cuenta la regulación de procesos proliferativos, como los que se dan en el cierre de herida (úlceras). En este proceso, células adyacentes a la zona de lesión migran a la herida, cubriendo la zona dañada. A continuación, se produce la proliferación, reemplazando las células perdidas. Finalmente, se da la maduración y diferenciación celular, para mantener la actividad de la mucosa (Sturm & Dignass, 2008). Todos estos procesos están regulados por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que promueve proliferación; citoquinas; así como el factor de crecimiento

transformante (TGF β), que actúa de modo ambivalente, promoviendo o inhibiendo la proliferación celular (Sturm & Dignass, 2008).

Teniendo en cuenta todos estos factores, el equilibrio entre los diversos procesos como proliferación, apoptosis, cierre de herida o identificación de bacterias “propias” y bacterias patógenas es difícil y complicado de mantener. Esto hace que la mucosa intestinal sea altamente susceptible a sufrir descompensaciones en dicho equilibrio, provocando la aparición de patologías.

2. Patologías asociadas a inflamación habituales en el colon.

Las patologías inflamatorias del intestino con mayor incidencia son la enfermedad de Crohn, que puede aparecer a lo largo de todo el tubo digestivo, y la colitis ulcerosa (CU), que suele aparecer en el colon (Bene *et al.*, 2011). Este tipo de patologías son características de sociedades modernas. Se han visto incrementadas desde mediados del siglo XX en los países desarrollados, existiendo una mayor incidencia de colitis ulcerosa que de la enfermedad de Crohn, de 1,2 a 20,3 casos por cada 100.000 habitantes por año y de 0,03 a 15,6 casos por cada 100.000 habitantes por año, respectivamente (Danese & Fiocchi, 2011). El tipo de entorno occidentalizado (consumo de tabaco, dietas ricas en grasas y azúcares, el uso de medicamentos, estrés y un alto nivel socio-económico), junto al modo de vida sedentario, son factores que aumentan el riesgo a padecer estas enfermedades (Molodecky & Kaplan, 2010; Danese *et al.*, 2004). Aunque la correlación entre factores genéticos y la patología no es tan clara en la CU como en la enfermedad de Crohn, si que parece existir cierta predisposición genética a padecer esta enfermedad, ya que se ha descrito una mayor incidencia de CU en aquellos individuos que presentaban antecedentes familiares previos (Rosenstiel *et al.*, 2009; Xavier & Podolsky, 2007; Podolsky, 2002; Kaser *et al.*, 2001).

La CU se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria recidivante, es decir, reaparece tiempo después de haberla padecido, lo que puede provocar que se haga crónica. También se caracteriza por el hecho de que sólo se vea comprometida la mucosa intestinal. Suele aparecer en la zona del recto y extenderse hacia las regiones media y proximal del colon. Los síntomas asociados a esta enfermedad son diarreas mucosas y sanguinolentas. La cronicidad de la CU puede derivar en la aparición de un cáncer de colon, lo que se conoce como cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Aunque no se conocen aún las causas exactas de la CU, si se sabe que en su aparición y desarrollo participan factores genéticos, inmunológicos y ambientales (Sobotta, 2010).

2.1. Inflamación en el colon: colitis ulcerosa.

Conservar la integridad de la barrera intestinal es importante para mantener su funcionalidad. La ruptura de esta integridad está asociada a alteraciones que afectan a la microflora bacteriana alojada en la capa de moco, el epitelio de la mucosa, así como, al sistema inmune innato y adaptativo localizados en la lámina propia de la mucosa. Una inapropiada y continua activación del sistema inmune de la mucosa, debida a la presencia de la flora intestinal habitual, causa enfermedades inflamatorias intestinales como la CU (Salim & Söderholm, 2011; Podolsky, 2002). Lo que aún no se sabe con certeza es si la pérdida de la integridad de la barrera intestinal es la causa o el efecto del proceso inflamatorio asociado (McGuckin *et al.*, 2009; Rosenstiel *et al.*, 2009).

2.1.1. Desregulación de la barrera intestinal.

Para poder entender la dinámica de la barrera intestinal durante la CU, hay que conocer previamente cómo se regula y mantiene. De modo habitual la mucosa

intestinal secreta una serie de sustancias que se localizan en la capa de moco, como la inmunoglobulina A (IgA), que mantiene la compartimentalización de la barrera intestinal y hace que las bacterias que constituyen la microflora no contacten con las células epiteliales (Macpherson & Uhr, 2004); la glicoproteína MUC2, principal componente del moco, que ayuda a retener moléculas antimicrobianas como las defensinas; o los péptidos “trébol” (*trefoil peptides*), que se secretan junto a MUC2 ayudando a su polimerización y a los procesos de cierre de herida (Salim & Söderholm, 2011). La alteración o la pérdida en la continuidad de la capa de moco hace que disminuyan las defensas de la mucosa frente a las bacterias simbiotes. Esto provoca que las bacterias entren en contacto con las células epiteliales subyacente, generando una respuesta inmune inapropiada. La cual, puede derivar en un proceso inflamatorio crónico (Salim & Söderholm, 2011; McGuckin *et al.*, 2009). En la CU es habitual la reducción en el número de células caliciformes, lo que conlleva un descenso en la producción y secreción de MUC2, disminuyendo la capa de moco y exacerbando la enfermedad (Tytgat *et al.*, 1996).

La barrera física constituida por las células epiteliales del intestino (IEC) está formada por una mono-capa continua de células polarizadas, unidas entre si mediante uniones estrechas y dinámicas (Salim & Söderholm, 2011). Uno de los mecanismos utilizado por los patógenos, para romper la integridad de la barrera intestinal, consiste en atacar a las proteínas que constituyen las uniones estrechas entre las IEC, disminuyendo así la resistencia trans-epitelial (Baumgart & Dignass, 2002). Además, las IEC juegan un papel muy importante en la detección de señales del medio externo y del lumen intestinal. Transmitiendo esta información a las células del sistema inmune que se localizan en la lámina propia (Singh *et al.*, 2005). Para poder desempeñar esta función, las IEC expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como son los receptores tipo Toll (TLRs) y los tipos NOD (NLRs) (Abreu, 2010). Una señalización inadecuada, a través de los PRRs, puede provocar una estimulación de la respuesta inflamatoria y derivar en una inflamación crónica (Fukata, Vamadevan *et al.*, 2009). Los TLR2 y TLR4 son los principales mediadores en la regulación de la inflamación intestinal. El TLR2 participa en la regulación de la integridad de la barrera intestinal (Podolsky *et al.*, 2009; Cario *et al.*, 2007; Pierik *et al.*, 2006), mientras que el TLR4 es un factor básico en la respuesta a daño epitelial, así como en la progresión de la inflamación crónica hacia la aparición de tumores (Fukata, Hernandez *et al.*, 2009; Hold *et al.*, 2007; Fukata *et al.*, 2005; Franchimont *et al.*, 2004).

2.1.2. Sistema inmune innato y adaptativo en el colon.

El sistema inmune innato y adaptativo de la mucosa intestinal está constituido por diversos tipos celulares (Fig. I-3), cuya actividad y tiempo de actuación puede ser muy difusa o extremadamente selectiva (Dignass *et al.*, 2004; Plevy, 2002; Fiocchi, 1997).

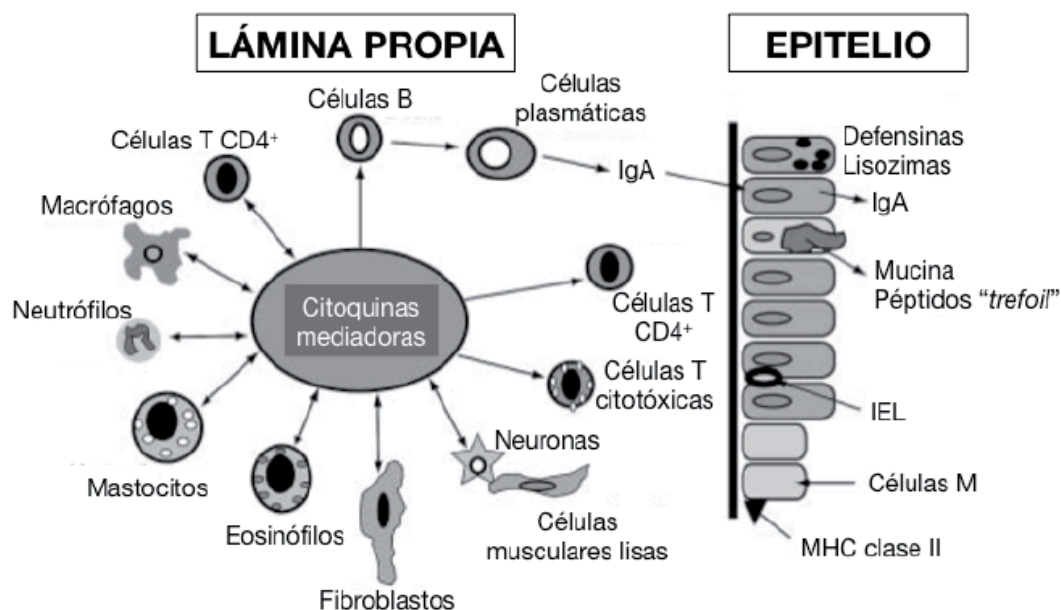


Fig. I-3. Células participantes en la respuesta inmune en la mucosa intestinal. IEL: Linfocitos intra-epiteliales; MHC clase II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II; IgA: Inmunoglobulina A. (Figura adaptada de Dignass *et al.*, 2004).

De modo habitual, la mucosa intestinal está constantemente monitorizada por las IEC, que controlan la composición del lumen intestinal mediante sus PRRs, y por células del sistema inmune innato como son los macrófagos, los neutrófilos o las células dendritas (DC) (Abreu, 2010; Xavier & Podolsky, 2007). Las DC juegan un papel muy importante en la conexión entre inmunidad innata y adaptativa, ya que son las encargadas de presentar los antígenos a las células T, que forman parte de la inmunidad adaptativa (Shih *et al.*, 2008).

La respuesta innata es un pre-requisito para la aparición de una inmunidad adaptativa excesiva, responsable del daño tisular que aparece en los pacientes con CU (Xavier & Podolsky, 2007). En situaciones de invasión de patógenos o ruptura de la barrera intestinal, se activa la respuesta inmune innata, produciéndose un reclutamiento de neutrófilos hacia la zona de inflamación. Este reclutamiento está mediado principalmente por la quimioquina CXCL8 (también denominada IL8), secretada por las IEC (Sansonetti, 2004). La presencia de los neutrófilos hace que se activen rutas pro-inflamatorias mediadas principalmente por NF- κ B y AP-1 (Tato & Hunter, 2002). Además, las IEC también participan en la inmunidad adaptativa. Colaboran con células presentadoras de antígenos, como DC, y con los linfocitos, localizados en folículos linfoides individualizados (Sansonetti, 2004; Fujimura *et al.*, 1992). Esta colaboración se produce principalmente en los folículos asociados al epitelio (FAE), donde las IEC realizan una translocación baso-lateral de antígenos y microorganismos, haciendo que contacten directamente con las DC, que en último término, activan la respuesta inmune adaptativa (Neutra *et al.*, 2003). Se ha descrito que las DC pueden emitir prolongaciones que atraviesan la barrera epitelial, hasta contactar directamente con el lumen intestinal y así, sondear la presencia de patógenos o sustancias tóxicas (Rescigno *et al.*, 2001). La activación de la respuesta adaptativa comporta la activación de células B, así como células T "helper", tanto Th1 como Th2 (Shih *et al.*, 2008; Macpherson & Uhr, 2004). Se ha descrito que ambos tipos celulares participan en la cronicidad de la inflamación del intestino, aunque en el caso de la CU la respuesta predominante es la mediada por Th2 (Salim & Söderholm, 2011; Danesse & Fiocchi, 2011; Shih *et al.*, 2008; Xavier & Podolsky, 2007; Podolsky

2002; Blumberg & Strober, 2001). Otro tipo de linfocito participante en la regulación de la inflamación intestinal son los linfocitos T reguladores (Treg) (Salim & Söderholm, 2011; Xavier & Podolsky, 2007). Tras ser estimulados por DC, secretan citoquinas anti-inflamatorias como IL10 y TGFb, participando en la supresión de la respuesta inmune, así como, en el mantenimiento de la integridad del epitelio de la mucosa (Suenart *et al.*, 2010; Howe *et al.*, 2005; Howe *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 1998).

Aunque no se conoce completamente la patogénesis de las enfermedades inflamatorias del intestino, si se sabe que alteraciones en el sistema inmune, tanto innato como adaptativo, son las responsables del inicio y de la cronicidad de la enfermedad (Dignass *et al.*, 2004).

2.2. Cáncer de colon.

El cáncer de colon se da al aparecer un tumor maligno o neoplasia en las células de la mucosa colónica y en sus glándulas. Habitualmente, las lesiones tumorales aparecen sobre lesiones pre-existentes, como pólipos o zonas de inflamación. Es excepcional la aparición de tumores en zonas sanas.

El cáncer de colon es el tipo de cáncer más frecuente en España y cada año hay 28.000 nuevos casos según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC, 2012). En otros países desarrollados, como EE.UU., es el segundo tipo de cáncer más frecuente, sólo superado por el cáncer de piel (*American Cancer Society*, 2012).

El origen del cáncer de colon puede tener dos causas:

- Cáncer de colon hereditario o familiar: suelen aparecer en individuos jóvenes, entre los 35 y los 40 años (AECC, 2012). Los más estudiados son la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP), que se caracteriza por la presencia de neoplasias benignas y el Cáncer Colorectal No Poliposis Hereditario, que se caracteriza por la aparición de tumores primarios sin la presencia de pólipos en el intestino (Sancho *et al.*, 2004).
- El cáncer de colon esporádico: suele aparecer en individuos entre los 65 y los 75 años (AECC, 2012). La incidencia de este tipo de cáncer está entorno al 75-80% de los casos diagnosticados (Morán *et al.*, 2010).

En función de los eventos moleculares que dan lugar a la aparición del tumor, el cáncer de colon esporádico puede desarrollarse siguiendo por dos rutas:

- La ruta canónica o supresora: implica inestabilidad cromosómica y se da en el 80-85% de los casos (Morán *et al.*, 2010). En 1990, Fearon y Vogelstein propusieron un modelo en el que co-existen alteraciones genéticas que se van produciendo a lo largo de los diferentes estadios de la enfermedad. Establecieron que la aparición del tumor se debe a mutaciones que activaban oncogenes y que silencian genes supresores de tumores. Para que el tumor sea maligno, debe haber mutaciones en cuatro o cinco genes. Éstas pueden darse en un orden cronológico concreto, pero al final, las características biológicas del tumor van a depender de que se den todas las mutaciones, no del orden en el que se producen (Fig. I-4).

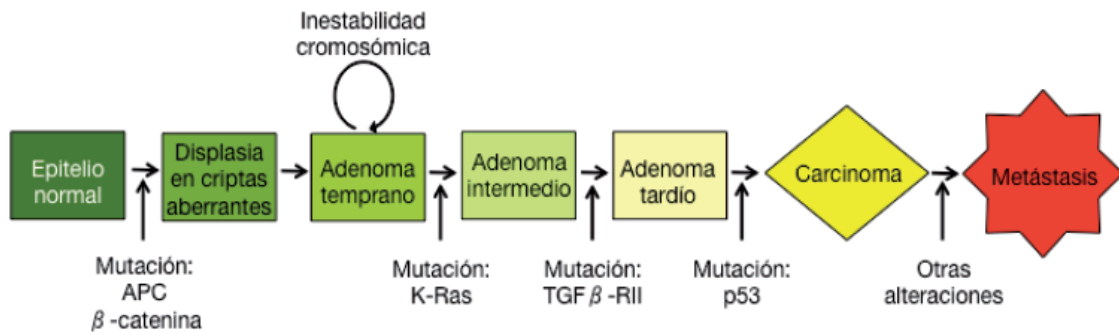


Fig. I-4. Esquema de la relación descrita entre las alteraciones genéticas y la progresión del cáncer de colon. (Figura adaptada de Fearon & Vogelstein, 1990).

- La ruta alternativa: implica inestabilidad en las regiones microsatélite del DNA, por lo que también se denomina ruta MSI-H. Se corresponde con el 15-20% de los casos (Morán *et al.*, 2010). Los microsatélites son secuencias cortas, que se repiten en tándem a lo largo de todo el genoma celular. La inestabilidad en estas regiones aparece debido a defectos en los genes que codifican para proteínas MMR, encargadas de reparar los fallos cometidos por la DNA polimerasa durante la replicación (Boland *et al.*, 1998) (Fig. I-5).

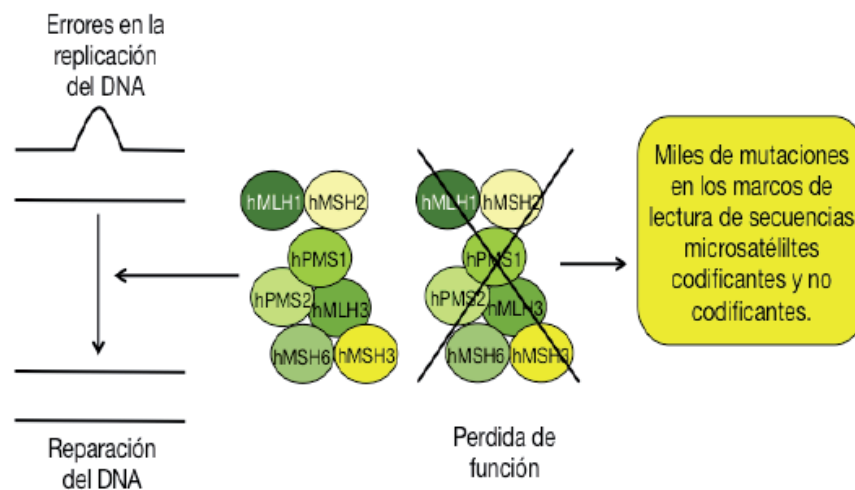


Fig. I-5. Mecanismo de la aparición de la inestabilidad a nivel de las secuencias microsatélites del DNA. (Figura adaptada de Morán *et al.*, 2010).

2.2.1. Ruta Wnt/ β -catenina.

Las proteínas Wnt son una amplia familia de glicoproteínas que están implicadas en la proliferación y la diferenciación celular mediante la regulación de procesos como la adipogénesis y la angiogénesis (Moon *et al.*, 2002). También participan en el mantenimiento de células progenitoras en el epitelio intestinal, en la piel y de células hematopoyéticas (Cadigan & Liu, 2006). Las proteínas Wnt son los ligandos de un complejo de receptores. Este complejo está constituido por alguno de los miembros de la familia Frizzled (Fz) y el receptor LRP5/6 (Staal *et al.*, 2002). En ausencia de Wnt, la proteína β -catenina citosólica, la proteína Axina, la proteína supresora de tumores APC, CK1 α y GSK3 se asocian formando un complejo. Ésto facilita su fosforilación secuencial, mediada por CK1 α (fosforila a β -catenina en el residuo S45) y por GSK3 (fosforila a β -catenina en los residuos S33, S27 y T41). La β -catenina fosforilada es reconocida por β -TrCP para su posterior ubiquitinación y

degradación vía proteasoma (Gao & Chen, 2009; Staal *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Cohen & Frame, 2001). Por el contrario, en presencia de Wnt, el complejo multiproteico formado por Dvl-Fz-LRP6 se asocia a la proteína Axina, CK1 α y GSK3 en la membrana plasmática, causando la disociación de β -catenina, lo que impide su fosforilación y posterior degradación. Por lo tanto, β -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde se une a factores de transcripción como Tcf y Lef, promoviendo proliferación celular (Li *et al.*, 2002; Polakis, 2000) (Fig. I-6).

Se ha descrito que una señalización inapropiada de la vía Wnt/ β -catenina contribuye a la aparición de numerosos tipos de cáncer (Wilson *et al.*, 2010; Taketo, 2006; Kolligs *et al.*, 2002). Entre ellos, el cáncer de colon es uno de los más ampliamente descritos (Burgess *et al.*, 2011; Elzagheid *et al.*, 2008; Schneikert & Behrens, 2007; Aoki & Taketo, 2007; Behrens & Lustig, 2004; Inomata *et al.*, 1996). Además, en la mayoría de los casos de cáncer de colon esporádico, la proteína APC está mutada (Polakis, 2007). Las mutaciones en APC o en β -catenina, contribuyen a la estabilización de ésta en el citosol y su translocación al núcleo de las células epiteliales del colon, causando una activación aberrante del factor de transcripción Tcf4 (Staal *et al.*, 2002; Fearnhead *et al.*, 2001).

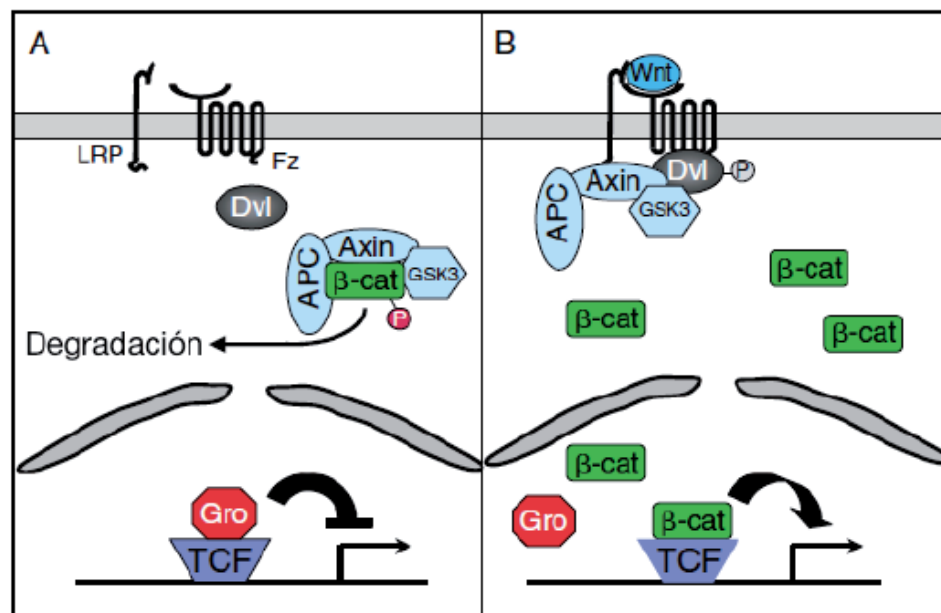


Fig. I-6. Ruta canónica de señalización Wnt/ β -catenina. A) Muestra la señalización que se desencadena cuando el factor Wnt no está unido a su receptor de membrana, concluyendo en la degradación de β -catenina vía proteasoma. B) Muestra la ruta de señalización que se produce cuando Wnt se une a su receptor, dando como resultado la translocación de β -catenina al núcleo activando factores de transcripción (Figura adaptada de Cardigan & Liu, 2006).

2.2.2. Ruta canónica K-Ras/Raf/MAPK.

La familia de proteínas Ras, son un grupo de pequeñas proteínas GTPasas que consta de tres isoformas (H-Ras, K-Ras y N-Ras). Su activación está controlada por el intercambio de GTP-GDP mediado por proteínas GEFs y GAPs (Sancho *et al.*, 2004; Bos, 1989). Existe un amplio número de receptores que activan esta ruta, como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G y receptores no tirosina quinasa (Malumbres & Barbacid, 2003).

Una vez que Ras es activa (unida a GTP), interacciona con una gran variedad de moléculas efectoras. La más estudiada y caracterizada es su interacción con la proteína Raf, denominándose la vía clásica Ras/Raf/MAPK (Sancho *et al.*, 2004). El complejo K-Ras/Raf se transloca a la membrana plasmática donde Raf se activa. A

continuación, Raf fosforila y activa a MKK1 y MKK2, que en último término fosforilan y activan a ERK1/2. ERK1/2 activa se transloca a núcleo, donde fosforila a un gran número de factores de transcripción, induciendo proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Hancock, 2003) (Fig. I-7).

Se ha descrito a la PI3K como otra molécula efectora de Ras, interaccionando con mayor afinidad con la isoforma H-Ras (Hancock, 2003). Otras moléculas efectoras de Ras son miembros de la familia de la proteína Rho (Shields *et al.*, 2000).

Las proteínas Ras participan en la regulación de múltiples procesos implicados en el crecimiento, la proliferación, la diferenciación o la apoptosis celular, por lo que un funcionamiento incorrecto de Ras puede derivar en la aparición de tumores (Hancock, 2003; Malumbres & Barbacid, 2003; Shields *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 1999). Se ha descrito que mutaciones puntuales en los tres genes que codifican para la familia de proteínas Ras, contribuyen a la aparición de cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, melanoma, leucemia y cáncer de colon (Tamaoki, 2001). En el caso del cáncer de colon, la frecuencia con la que aparece mutado el gen que codifica para K-Ras oscila entre el 38% y 50% (Sancho *et al.*, 2004). Se ha descrito que mutaciones en K-Ras contribuyen, no sólo a la formación del tumor, si no también a su progresión y transformación en tumor maligno (Rajagopalan *et al.*, 2003).

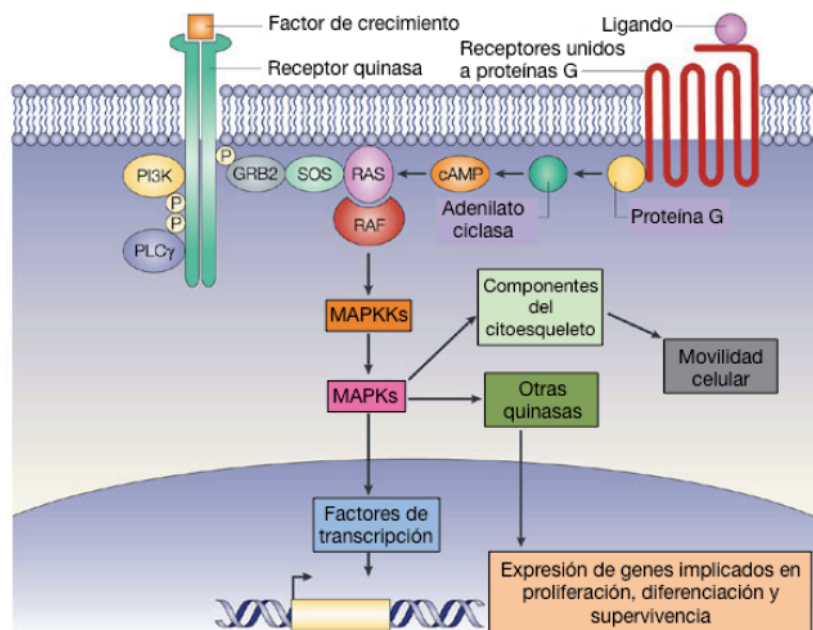


Fig. I-7. Ruta canónica Ras/Raf/MAPK. (Figura adaptada de Dibb *et al.*, 2004).

2.2.3. Metaloproteinasas de matriz (MMPs).

Las MMPs, son una familia de enzimas que pueden estar unidas a la superficie celular o pueden ser secretadas (Sternlicht & Werb, 2001). Se activan por proteólisis y están fuertemente reguladas, tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional. Además, también pueden estar controladas por proteínas activadoras (que pueden ser otras proteínas o MMPs), por inhibidores endógenos (denominados TIMPs) y por su localización en la superficie celular (Sternlicht & Werb, 2001). La proteólisis necesaria para la activación de las MMPs, así como la inhibición que sufren por parte de los TIMPs, hacen que la detección de altos niveles de MMPs no siempre indique un incremento en la actividad enzimática de

las mismas (Nelson *et al.*, 2000). Las MMPs juegan un papel esencial en la respuesta celular ante el microambiente que las rodea. Participan, principalmente, en la degradación de proteínas estructurales de la matriz extracelular (ECM) como el colágeno o la laminina (Cabibi *et al.*, 2009). Modulan tanto las interacciones célula-célula, como las interacciones célula-ECM, lo que hace que participen en la diferenciación, la migración, la proliferación y la supervivencia celular (Davies *et al.*, 1993).

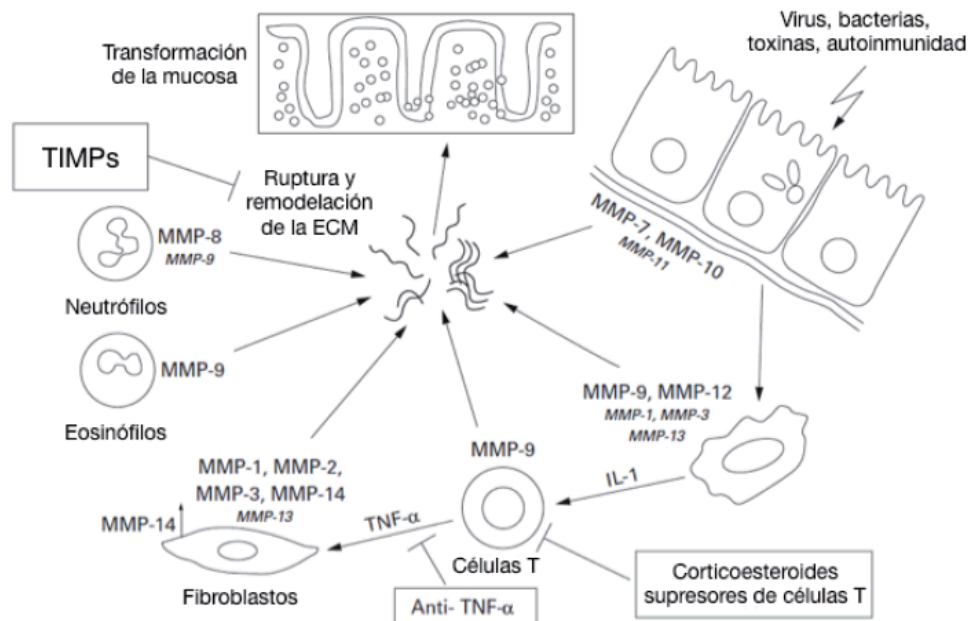


Fig. I-8. Producción de MMPs en el intestino durante la inflamación de la mucosa. (Figura adaptada de Schuppan & Hann, 2000).

Se ha descrito la participación de las MMPs en diversas patologías como enfisema, artritis reumatoide, arterioesclerosis o infarto de miocardio. Pero en la enfermedad que más ampliamente se ha descrito la participación de las MMPs es en el cáncer e invasión tumoral (Garg *et al.*, 2010; Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Sternlicht & Werb, 2001; Sternlicht *et al.*, 2000; McKerrrow *et al.*, 2000). Además participan en procesos inflamatorios, como la inflamación intestinal (Okamoto & Watanabe, 2005; Baugh *et al.*, 1999). Las MMPs producidas por las células epiteliales regulan la inflamación, controlando diferentes procesos como la migración trans-epitelial de leucocitos o la activación y compartimentalización de quimioquinas (Parks *et al.*, 2004). Se ha descrito que en tejidos dañados, tanto las células epiteliales como las estromales, expresan una amplia variedad de MMPs, entre las que se encuentran la MMP9 (Gill & Parks, 2008).

En el CAC se unifican procesos inflamatorios y procesos tumorales. Se ha observado que las MMPs son las proteinasas predominantes en la mucosa intestinal durante las enfermedades inflamatorias y, se ha descrito, que una de las MMPs que aparece sobre-expresada en la inflamación intestinal es la MMP9 (Garg *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2010; Castaneda *et al.*, 2005; von Lampe *et al.*, 2000; Schuppan & Hann, 2000; Seifert *et al.*, 1996) (Fig. I-8). Recientemente, se ha propuesto el posible papel de MMP9 como supresor de tumores en el CAC, activando Notch1 e incrementando la expresión de p53, aumentando así el proceso de apoptosis y disminuyendo el crecimiento celular (Garg *et al.*, 2011).

2.3. Conexión entre inflamación y cáncer.

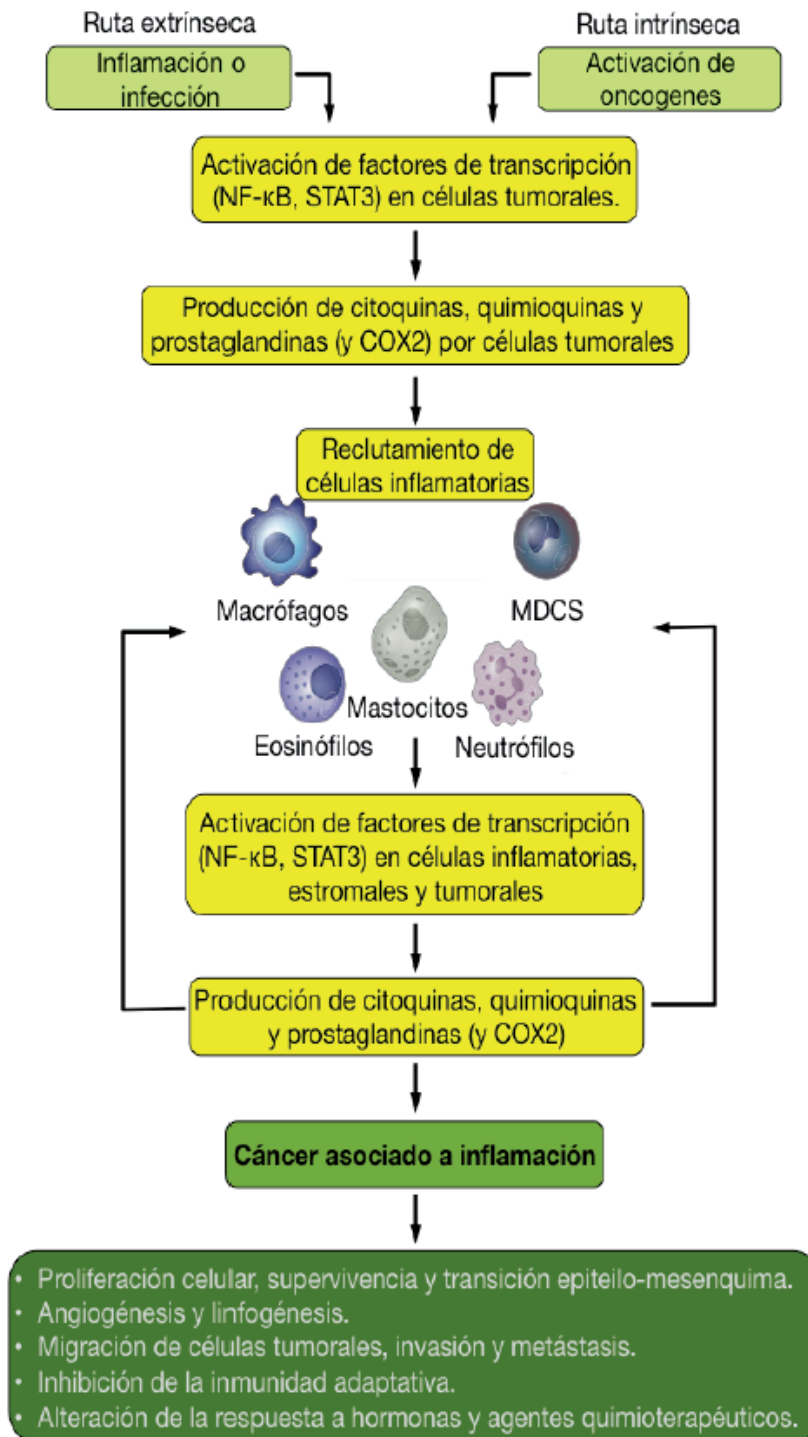


Fig. I-9. Rutas de conexión entre inflamación y cáncer. (Figura adaptada de Mantovani *et al.*, 2008).

Fue Rudolf Virchow, en 1863, quien relacionó por primera vez inflamación y cáncer, al observar la presencia de leucocitos en tejido neoplásico, sugiriendo que esta infiltración reflejaba el origen de la aparición del tumor en una zona de inflamación crónica (revisado en Balkwill & Mantovani, 2001).

Los factores desencadenantes de la inflamación crónica que deriva en cáncer pueden ser infecciones por microbios, enfermedades autoinmunes o condiciones inflamatorias sin un origen genético conocido (Allavena, Garlanda *et al.*, 2008).

Alrededor del 15% de los tumores totales diagnosticados se atribuyen a factores infecciosos, al mismo tiempo, se calcula que entorno al 20% de las muertes por cáncer, se asocian a infecciones crónicas e inflamación (Porta *et al.*, 2009; Balkwill & Mantovani, 2001).

La relación entre inflamación y cáncer puede definirse como la interacción entre dos rutas: una ruta intrínseca, controlada por alteraciones genéticas que derivan en inflamación y neoplasia, y una ruta extrínseca, mediada por señales inflamatorias y enfermedades autoinmunes (Mantovani *et al.*, 2008) (Fig. I-9). Los responsables de la conexión entre la vía extrínseca y la vía intrínseca incluyen: factores de transcripción como NF- κ B o STAT3; citoquinas pro- y anti-inflamatorias como IL1 β , IL6, IL10 o TNF α (Colotta *et al.*, 2009); quimioquinas como CXCL8/IL8 o CCL2 (Coussens *et al.*, 2002) y enzimas como COX2 (Porta *et al.*, 2009). También cabe destacar en la conexión entre ambas rutas, la participación de células del sistema inmune como macrófagos, DC, neutrófilos y linfocitos T (Grivennikov *et al.*, 2010; Porta *et al.*, 2009; Mantovani *et al.*, 2008; de Visser & Coussens, 2005; Coussens *et al.*, 2002; Balkwill & Mantovani, 2001).

Uno de los ejemplos de cáncer asociado a inflamación más estudiado en los últimos años es el caso del CAC, en el que una inflamación crónica del intestino deriva en la aparición de cáncer (Jawad *et al.*, 2011; Rizzo *et al.*, 2011; Saleh & Trinchieri, 2011; Danese & Mantovani, 2010; Terzic *et al.*, 2010; Roessner *et al.*, 2008).

2.3.1. Células inflamatorias: macrófagos, neutrófilos y linfocitos.

En la aparición y progresión tumoral tiene un papel muy importante la vigilancia realizada por el sistema inmune. La “inmuno-edición” tumoral es el concepto más completo para explicar el papel que realiza el sistema inmune en el desarrollo del tumor (Swann & Smyth, 2007). Este proceso se divide en tres fases: (i) la fase de eliminación, donde el sistema inmune detecta y elimina las células tumorales; (ii) si esta fase es incompleta, se produciría un estado temporal de equilibrio, donde las células tumorales están en estado de latencia y acumulando alteraciones genéticas; (iii) si la presión que ejerce el sistema inmune sobre estas células no las elimina, se produce una selección de células tumorales resistentes, dando paso a la fase de escape, donde el sistema inmune no logra contener el crecimiento y se desarrolla el tumor (Dunn *et al.*, 2004).

El entorno inflamatorio, donde se lleva a cabo la vigilancia, está constituido por células inflamatorias como macrófagos, varios subgrupos de linfocitos T o neutrófilos. Estos tipos celulares pueden ser tanto residentes en el tejido como reclutados debido al proceso inflamatorio (Lin & Karin, 2007). En cualquier caso, estas células pueden ejercer un papel tanto promotor como inhibidor del desarrollo tumoral (Grivennikov *et al.*, 2010; Swann & Smyth, 2007; de Visser *et al.*, 2006).

Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias en ser reclutadas y activadas en la zona de infección o daño tisular (Coussens & Werb, 2002). Pueden desempeñar tanto una función anti-tumoral como pro-tumoral (Fridlender *et al.*, 2009). Para que se de el alojamiento de los neutrófilos en la zona de inflamación, es necesaria la participación de mediadores pro-inflamatorios, moléculas de adhesión, quimiotácticos y quimioquinas (Parkin & Cohen, 2001). Por tanto, los neutrófilos son las primeras células inmunes en responder a citoquinas pro-inflamatorias como TNF α o IL1 β . Comenzando a restablecer el tejido dañado, mediante la inducción de la expresión de MMPs (Coussens & Werb, 2002), así como eliminando elementos patógenos, mediante una doble respuesta: una dependiente del oxígeno, generando especies reactivas del oxígeno (ROS), y otra independiente, utilizando proteínas y enzimas tóxicas,

como la lisozima, localizada en gránulos en el citoplasma (Parkin & Cohen, 2001). Una inapropiada respuesta de estas células puede conllevar un daño tisular, así como, la cronicidad del proceso inflamatorio. Se ha descrito la participación de ROS en carcinogénesis, mediante la oxidación del DNA. Esto produce transformación celular, acumulación de mutaciones e inestabilidad genética. Todas estas modificaciones conllevan alteraciones en procesos como proliferación celular (vía MAPKs), supervivencia, angiogénesis, invasión o metástasis (Roessner *et al.*, 2008).

Los macrófagos van a ser las siguientes células inmunológicas en migrar y activarse en la zona de inflamación. Son los principales productores de factores de crecimiento y citoquinas, afectando profundamente a las células epiteliales y mesenquimales del tejido (Coussens & Werb, 2002). La heterogeneidad en el linaje de los macrófagos se da como resultado de su especialización, la cual se debe a la influencia del microambiente que les rodea. Esto les hace ser unas células efectoras cruciales en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune innata (Geissmann *et al.*, 2010; Gordon & Taylor, 2005). Los macrófagos pueden clasificarse en dos subgrupos (Murray & Wynn, 2011; Sheikh & Plevy, 2010; Grivennikov *et al.*, 2010; Geissmann *et al.*, 2010; Sica & Larghi *et al.*, 2008):

- Macrófagos M1 o de activación clásica: se activan por $\text{IFN}\gamma$ y sustancias microbianas como LPS. Producen elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6 o IL23. Fenotípicamente, aumentan la expresión del MHC e iNOS, así como de un amplio número de quimioquinas. Tienen capacidad para eliminar patógenos y activar una respuesta inmune anti-tumoral. Promueven la respuesta inmune mediada por linfocitos Th1, gracias a la producción de IL12.
- Macrófagos M2 o de activación alternativa: se activan por IL4, IL10 e IL13. Participan en la producción de IL10 y arginasa. Fenotípicamente, presentan un descenso en la expresión del MHC II y de IL12. Participan en procesos de cierre de herida, regulando la producción de matriz extracelular. Además, desempeñan una función reguladora en la respuesta inmune innata y adaptativa, y limitan la inflamación, produciendo mediadores anti-inflamatorios como IL10 y $\text{TGF}\beta$. Los macrófagos M2 participan en la diferenciación de la respuesta inmune hacia una respuesta mediada por linfocitos Th2. Se cree que la mayoría de los macrófagos asociados a tumores (TAM) son de tipo M2.

Durante la inflamación crónica los macrófagos M1 predisponen al tejido para el desarrollo del tumor. Por el contrario, durante el establecimiento del tumor, hay una mayor activación de macrófagos M2. En tumores establecidos hay niveles bajos de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ o IL6), mientras que los niveles de citoquinas anti-inflamatorias (IL10) son más altos (Porta *et al.*, 2009). Los TAM representan la mayor población de células inmunes infiltradas en tumores malignos como el cáncer de colon, mama, pulmón y próstata. Su reclutamiento y activación se consideran factores básicos en la progresión tumoral (Sica & Bronte, 2007; Mantovani *et al.*, 2002). Los TAM contribuyen a la progresión y el crecimiento tumoral participando en tres procesos principalmente: (i) angiogénesis, que se ve favorecida por la producción de factores pro-angiogénicos ($\text{TGF}\beta$, VEGF, PDGF, CXCL8/IL8 o CXCL12) y factores de adaptación a condiciones de hipoxia (HIF-1/2); (ii) la remodelación de la ECM, produciendo proteinasas como las MMPs; y (iii) la supresión de la respuesta inmune anti-tumoral, mediante su baja capacidad para activar la respuesta inmune adaptativa por presentación de antígenos, así como, inhibiendo la proliferación de células T (Allavena, Sica *et al.*, 2008; Sica, Allavena *et al.* 2008).

Los linfocitos T también están ampliamente presentes en el micro-entorno tumoral. Pueden desempeñar un papel tanto pro-tumoral como anti-tumoral (Grivennikov *et al.*, 2010). Se pueden dividir en:

- Linfocitos T citotóxico (Tc): presentan en su superficie moléculas CD8 y tienen una función antiviral (Parkin & Cohen, 2001). También participan en la respuesta inmune anti-tumoral (Rizzo *et al.*, 2011). Expresan elevados niveles de FasL e IFN γ , que aumentan la apoptosis (Itoh *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1998); así como, perforina y grancima A y B, que promueven la permeabilización celular y la muerte (Brenna *et al.*, 2010; Cullen *et al.*, 2010). Un aumento en la infiltración de linfocitos Tc en el tumor correlaciona con un buen pronóstico en determinados tipos de cáncer. En el cáncer de colon participan en la eliminación de las células tumorales (Grivennikov *et al.*, 2010; Swann & Smyth, 2007).
- Linfocitos T “helper” (Th): presentan en superficie moléculas CD4, reconocen antígenos extraños y activan otras células que participan en la respuesta inmune, como las células B (Parkin & Cohen, 2001). En función del patrón de citoquinas secretadas podemos diferenciar varios tipos de linfocitos Th:
 - Los Th1 secretan mayoritariamente IFN γ , IL2 e IL12 (Rizzo *et al.*, 2011; Parkin & Cohen, 2001). En el caso de la inflamación intestinal, estas células median procesos inflamatorios relacionados con la enfermedad de Crohn, desempeñando un papel protector. En el CAC, contribuyen a disminuir la incidencia de cáncer (Rizzo *et al.*, 2011). También se ha descrito que la activación de los linfocitos Th17, mediada por IL23, desempeñan un papel pro-tumoral en el CAC, mediante la secreción de IL17. (Walder & Neurath, 2009; Oppmann *et al.*, 2000).
 - Los Th2 secretan principalmente TGF β , IL4, IL5, IL10 e IL13 (Mantovani *et al.*, 2002; Parkin & Cohen, 2001). Este tipo de respuesta correlaciona con la progresión tumoral en el caso del cáncer de colon, tanto en modelos experimentales como en humanos (Rizzo *et al.*, 2011). La infiltración de linfocitos Th2 en tumores y la producción de citoquinas IL4, IL13 e IL10, pueden participar en el reclutamiento y proliferación *in situ* de macrófagos, así como ayudar a la diferenciación de los macrófagos hacia M2 (Jenkins *et al.*, 2011; Biswas & Mantovani, 2010; Mantovani *et al.*, 2002).
- Los Treg fueron descritos por primera vez como una población de linfocitos CD4+ que expresan altos niveles de CD25 (Sakaguchi *et al.*, 1995). Estos linfocitos pueden inhibir células efectoras en el tumor, como Tc y Th, mediante contacto célula-célula y/o la producción de citoquinas como IL10 o TGF β (Curiel, 2007). Por lo que se les atribuye un papel principalmente pro-tumoral, aunque también pueden ejercer un papel anti-tumoral, gracias a su capacidad de suprimir la respuesta inflamatoria que promueve la formación de tumores (Grivennikov *et al.*, 2010; Erdman *et al.*, 2005).

2.3.2. Moléculas que relacionan inflamación y cáncer: citoquinas, STAT3, COX2 y NF- κ B.

Existe una gran variedad de citoquinas, que independientemente de su procedencia, desempeñan un papel en la progresión tumoral. Participan en la regulación de la activación de varias moléculas efectoras como factores de transcripción (NF- κ B, STAT3, HIF-1 α) o caspasas (Porta *et al.*, 2009; Lin & Karin, 2007). Hay citoquinas que inhiben la progresión tumoral favoreciendo la inmunidad anti-tumoral (IL12, IFN γ), mientras que otras favorecen la progresión tumoral (IL6, IL17). Además, también tienen un efecto directo sobre el crecimiento y la

supervivencia de las células tumorales (IL6, TNF α , TGF β) (Grivennikov *et al.*, 2010) (Fig. I-10).

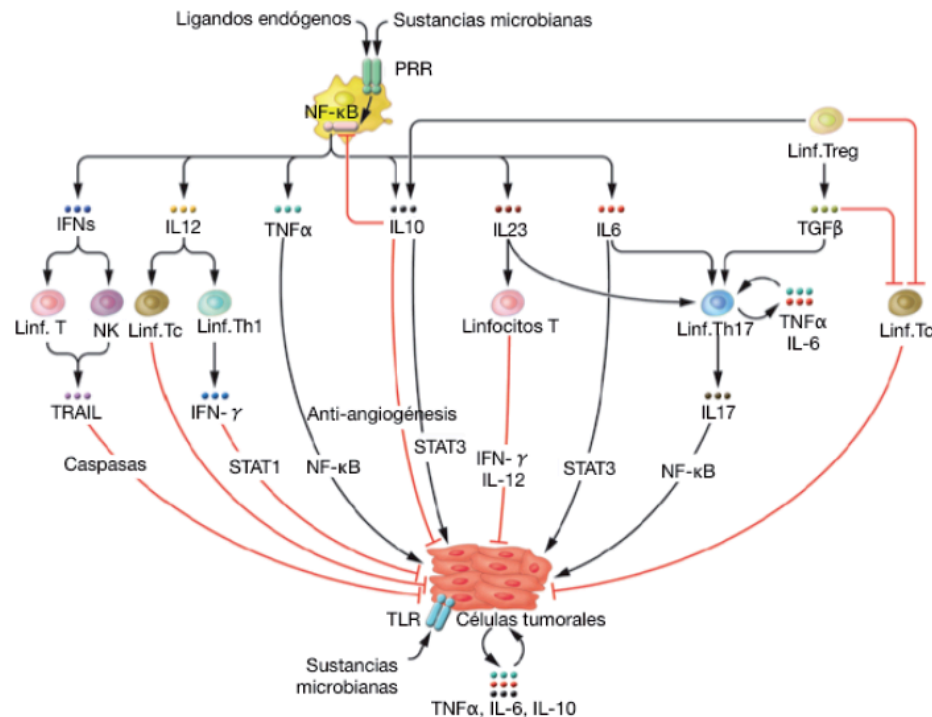


Fig. I-10. Efecto de diferentes citoquinas en la progresión tumoral. La interacción entre varios tipos celulares del sistema inmune determinan el efecto de las citoquinas en el desarrollo y progresión tumoral. TRAIL: Ligando que induce apoptosis mediada por TNF α , NK: *Natural killers cells*. (Figura adaptada de Lin & Karin, 2007).

Los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 son especialmente importantes en el desarrollo del CAC; al igual que se ha observado que hay citoquinas como TNF α , IL6 e IL1 β , que promueven la aparición de CAC o citoquinas como IL10 o TGF β , que inhiben la aparición de tumores en el colon (Terzic *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Popivanova *et al.*, 2008; Tang, Katuri *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 1996).

TNF α desempeña un papel dual, a elevadas concentraciones puede producir la muerte de células endoteliales, así como de células tumorales (Danese & Mantovani, 2010; Porta *et al.*, 2009) y a bajas concentraciones, como las que se producen en la inflamación crónica, promueve tumorigénesis. Por tanto, se le considera como un factor promotor de tumoración (Terzic *et al.*, 2010). TNF α puede ser producido por las células tumorales o inflamatorias localizadas en el entorno tumoral. Promueve la supervivencia de las células tumorales, mediante la activación (vía NF- κ B), de genes anti-apoptóticos (Luo *et al.*, 2004). También está relacionado con la fase de iniciación del tumor, estimulando la producción de moléculas genotóxicas como NOS y ROS (Hussain *et al.*, 2003). Por tanto, TNF α contribuye al desarrollo tumoral mediante su participación en el inicio tumoral, la proliferación, la angiogénesis y la metástasis (Lin & Karin, 2007). En el caso del CAC tanto los niveles de mRNA como de proteína se ven incrementados en el entorno tumoral (Terzic *et al.*, 2010). Se ha descrito que TNF α es crucial en la promoción de la metástasis en el hígado a partir de células de adenocarcinoma de colon (Kitakata *et al.*, 2002).

La IL1 β es otra citoquina que se produce durante los primeros estadios de la respuesta inflamatoria. Al igual que TNF α , presenta un papel dual en el desarrollo de cáncer asociado a inflamación. A bajas concentraciones, produce una

respuesta inflamatoria local, que activa una respuesta inmune protectora frente al tumor. Por el contrario, a altas concentraciones, se desencadena una respuesta inflamatoria dañina asociada a cáncer (Apte & Voronov, 2002). Se ha observado que en pacientes con CAC hay una sobre-expresión de IL1b, mediando en el desarrollo tumoral (Peterson *et al.*, 2007).

La IL6 está relacionada con rutas inflamatorias que promueven el inicio y la progresión tumoral (Porta *et al.*, 2009). Está implicada en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular en varios tipos de cáncer como linfoma, melanoma o cáncer de próstata. También se ha descrito su participación en la regulación de la supervivencia de las células tumorales y en metástasis (Mihara *et al.*, 2012). Actúa a través de dos moléculas, la IL6R y la gp130. Ambas se localizan en la membrana celular, pero la región citoplasmática de gp130 presenta varios dominios que desencadenan la señalización intracelular. Uno de estos dominios interacciona con JAK1, que activará al factor de transcripción STAT3 (Bromberg & Wang, 2009). La activación de STAT3 es la respuesta predominante que desencadena la IL6, y está implicada en procesos de proliferación y supervivencia, promoviendo tumorigénesis (Lin & Karin, 2007). Se ha descrito ampliamente la importancia de la IL6 en el desarrollo del CAC (Grivennikov *et al.*, 2009; Bollrath, Phesse *et al.*, 2009). Mediante el uso de animales transgénicos (con ganancia o pérdida de funcionalidad) se ha observado que la IL6, principalmente producida por las células mieloides de la lámina propia del colon, promueven proliferación y supervivencia de las células intestinales malignas, contribuyendo al inicio y progresión del CAC (Grivennikov *et al.*, 2009; Bollrath, Phesse *et al.*, 2009; Greten, Eckman *et al.*, 2004). Recientemente, se ha relacionado la aparición de CAC con la presencia de macrófagos M2, que son una de las principales fuentes de producción de factores promotores de la tumoración, como la IL6 (Schiechl *et al.*, 2011). Como ya hemos mencionado, la inflamación intestinal se asocia a elevados niveles de IL6, siendo éstos y los de STAT3, mayores en individuos con CU y con CAC que en individuos control o con CU inactiva (Li *et al.*, 2010; Podolsky, 2002). Por otro lado, la IL6 participa también en promover la diferenciación de linfocitos T hacia Th17, favoreciendo y manteniendo la inflamación intestinal, así como regulando la supervivencia de linfocitos T pro-inflamatorios (Terzic *et al.*, 2010; Leppkes *et al.*, 2009).

La IL10 es una citoquina inmunosupresora y anti-inflamatoria. Actúa inhibiendo al factor de transcripción NF- κ B, lo que provoca la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α o IL6 (Pestka *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2001; Schottelius *et al.*, 1999). Se ha descrito que en ratones deficientes en IL10 hay un mayor desarrollo de CAC, produciéndose una respuesta inmune inadecuada, mediada por la producción de citoquinas de tipo Th1 (IL6) (Danese & Mantovani, 2010; Berg *et al.*, 1996). También se ha descrito la participación de la IL10 en la regulación de linfocitos Treg, inhibiendo la inflamación intestinal, la displasia y el cáncer de colon (Maloy *et al.*, 2003).

La IL10 podría estar controlando la inflamación intestinal mediante la inhibición de los procesos inflamatorios mediados por IL12 o por la inhibición del factor NF- κ B (Schottelius *et al.*, 1999; Leach & Rennick, 1998). Por otro lado, también se ha descrito un papel pro-tumoral de esta citoquina, mediante la activación de STAT3. Esto causaría una sobre-regulación de genes anti-apoptóticos como Bcl2 o Bcl-xL (Alas *et al.*, 2001). Por tanto, la IL10 puede ejercer un papel tanto tumoral como anti-tumoral, dependiendo de su interacción con otras citoquinas y factores que se encuentren en el entorno tumoral (Lin & Karin, 2007).

La vía de TGF β no sólo actúa a través de factores de transcripción como SMAD, si no que también actúa a través de la activación de las MAPKs (Derynck & Zhang, 2003; Derynck *et al.*, 2001). Alteraciones en esta cascada de señalización

pueden derivar en la formación de tumores como ocurre en el cáncer de colon. Junto a la IL10, es una de las principales moléculas implicadas en inmunosupresión y procesos anti-inflamatorios (Lin & Karin, 2007).

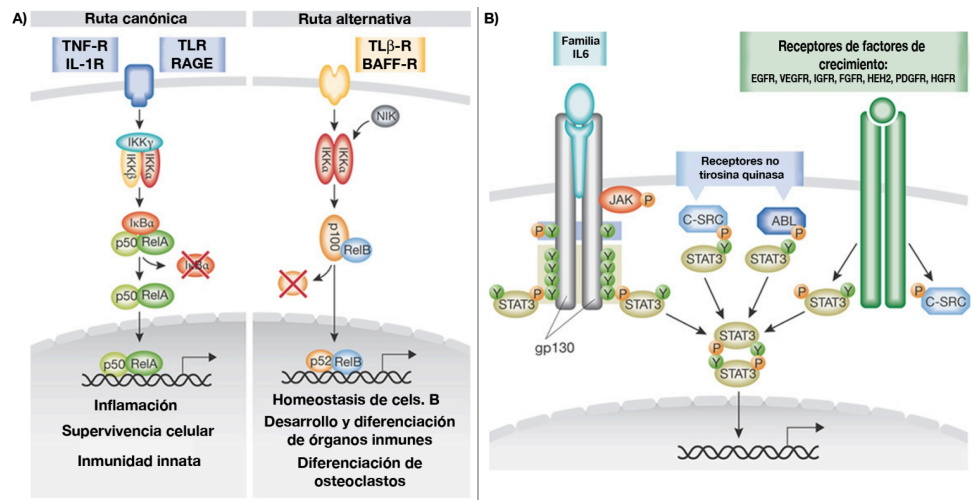


Fig. I-11. Rutas de señalización canónica y alternativa de NF-κB (A) y de STAT3 (B). (Figuras adaptadas de Bollrath & Greten, 2009).

STAT3 es un factor de transcripción que se induce principalmente por la ruta de señalización mediada por IL6 (Heinrich *et al.*, 1998; Darnell *et al.*, 1994). Su activación puede estar medida por: receptores de citoquinas, algunos de ellos acoplados a proteínas con actividad tirosina quinasa como la familia JAK (como es el caso de la IL6); receptores de factores de crecimiento como VEGFR o PDGFR y por onco-proteínas como Src, que no presentan receptores tirosina quinasa (Yu *et al.*, 2007). Su actividad está controlada por moléculas supresoras de la ruta de señalización mediada por citoquinas (SOCS) o por proteínas supresoras de la actividad de STAT (PIAS) (Shuai & Liu, 2005; Alexander, 2002) (Fig. I-11.B). Se ha descrito a STAT3 como una de las moléculas donde convergen un gran número de rutas oncogénicas. Se ha observado que aparece constitutivamente activada y a elevadas concentraciones, tanto en células tumorales como en células inmunes del entorno tumoral (Mantovani *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007). En procesos tumorales, STAT3 regula la proliferación y la supervivencia celular, así como la angiogénesis, controlando factores anti-apoptóticos (Bcl-xL), factores de transcripción (myc o ciclina D1) o factores pro-angiogénicos (VEGF, HIF-1α o MMP9) (Xu *et al.*, 2005; Yu & Jove, 2004; Wei *et al.*, 2003; Niu *et al.*, 2002; Catlett-Falcone *et al.*, 1999). También se ha descrito que la activación de STAT3, en las células tumorales, aumenta la capacidad del tumor a escapar del control del sistema inmune, inhibiendo la maduración de las DC y suprimiendo la respuesta inmune (Kortylewski *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). También promueve la tumorigénesis mediante la inhibición de la expresión de IL12 y la sobreproducción de IL23 e IL17. Ambas citoquinas relacionadas con inhibición y proliferación tumoral, respectivamente (Yu *et al.*, 2007). En el CAC, la activación de STAT3 a través de la ruta de señalización de la IL6, se considera crucial para la regeneración epitelial tras el daño y posterior desarrollo del tumor (Saleh & Trichieri, 2011). Aunque también se ha descrito un papel dual de STAT3 en la mucosa intestinal. Por un lado, como anti-inflamatorio, ejerciendo un efecto protector y por otro, como factor potenciador del crecimiento tumoral (Bollrath, Phesse *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2009).

NF-κB es un factor de transcripción cuya familia, en mamíferos, esta formada por cinco proteínas (RelA/p65, c-Rel, RelB, NF-κB1/p50, NF-κB2/p52). Todos los

miembros presentan: un dominio de unión a DNA homólogo a Rel, el cual es necesario para la formación de homo o heterodímeros y para su localización nuclear, y un dominio de unión a la proteína inhibidora I κ B (Ghosh & Karin, 2002; Baldwin, 1996). La actividad de NF- κ B está regulada por la familia de inhibidores I κ B, que se unen a dímeros de NF- κ B en el citosol. Esto hace que NF- κ B no pueda migrar a núcleo y no active la transcripción génica (Karin, 2006). A su vez, el inhibidor I κ B está regulado por fosforilación (mediada por IKKs) y poli-ubiquitinación. Cuando I κ B se fosforila entonces se degrada vía proteasoma. Al degradarse I κ B, NF- κ B es liberado y se transloca a núcleo donde ejerce su función (Wang *et al.*, 2009). Este factor de transcripción puede tener dos rutas de activación, una canónica y otra alternativa. Ambas participan en la conexión entre los procesos inflamatorios, los procesos de transformación celular y la progresión tumoral (Karin, 2006) (Fig. I-11.A). Por todo ello, se considera a NF- κ B como la molécula que conecta inflamación con cáncer. Los genes diana de NF- κ B se pueden agrupar en cuatro categorías (Greten & Karin, 2004): (I) genes anti-apoptóticos, entre los que se encuentran miembros de la familia de Bcl2 (Karin & Lin, 2002); (II) genes inmunológicos e immuno-reguladores, como los que codifican para la IL6 o TNF α (Karin, 2006); (III) genes que pueden regular positivamente el ciclo celular como ciclina D1 o c-myc (Hinz *et al.*, 1999; Romashkova & Makarov, 1999) y (IV) genes que codifican para moléculas que regulan negativamente a NF- κ B. Por tanto, NF- κ B va a jugar un papel muy importante en los procesos tumorigénicos y en la invasión tumoral, ya que promueve angiogénesis mediante la regulación de factores de crecimiento como VEGF (Chilov *et al.*, 1997); la sobre-activando COX2 (Karin, 2006) o activando a MMP9 (Takeshita *et al.*, 1999) En el CAC, en la inflamación crónica previa a la enfermedad, se producen citoquinas y quimioquinas que provocan una respuesta inmune localizada. Esto hace que aumente la supervivencia de las células pre-malignas, mediante la activación de NF- κ B (Wang *et al.*, 2009). Hay estudios en los que eliminando la quinasa IKK β de forma selectiva en células epiteliales del intestino o en células mieloides, se atenúa la formación de tumores en el colon, disminuyendo el número y el tamaño de los mismos (Greten, Eckmann *et al.*, 2004). También se ha descrito una reducción en el número y tamaño de los tumores al inhibirse la señalización mediada por IL6. Como la IL6 es un regulador de NF- κ B que actúa en células epiteliales e inmunes, regula el crecimiento de células tumorales en los primeros estadios del CAC (Grivennikov *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito en el cáncer de colon, la relación entre NF- κ B y la presencia de b-catenina en núcleo (Lauscher *et al.*, 2010). b-catenina podría inducir la transcripción de proteínas que contribuyen a acelerar la degradación de I κ B, activándose la ruta canónica de NF- κ B.

Por tanto, las principales rutas implicadas en el desarrollo de tumores y activadas por citoquinas convergen en dos factores de transcripción: STAT3 y NF- κ B (Bollrath & Greten, 2009). En el CAC, la expresión de citoquinas en las células epiteliales del colon inducida por NF- κ B, es esencial para la activación de STAT3 en las IEC durante la colitis aguda (Eckman *et al.*, 2008). Por tanto, NF- κ B controla la actividad de STAT3 en las IEC de dos modos: reclutando células mieloides que secreten citoquinas que activan a STAT3 y controlando la transcripción de estas citoquinas en las células mieloides (Bollrath & Greten, 2009).

COX2 participa en la conversión del ácido araquidónico en lípidos mediadores de la inflamación, como las prostaglandinas. En la mayoría de los tejidos normales no es detectable, pero es rápidamente inducida en respuesta a mitógenos, citoquinas (IL1 β , TNF α o IFN γ) y promotores tumorales como K-Ras. Por lo que se

acumulan prostaglandinas en los tejidos neoplásicos e inflamados (Wang & Dubois, 2010; Eisinger *et al.*, 2007). También se induce por entornos de hipoxia, por acción de HIF-1 α (Kaidi *et al.*, 2006). Su expresión está regulada tanto a nivel transcripcional, por varios factores de transcripción (NF- κ B o AP-1) como a nivel post-transcripcional (Wang & Dubois, 2010). Estudios epidemiológicos han demostrado que el uso prolongado de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos disminuye el riesgo a desarrollar cáncer, probablemente debido a la inhibición de COX2 (Dannenberg & Subbaramaiah, 2003). La inducción inadecuada de COX2, así como de las prostaglandinas, se ha relacionado con un gran número de patologías tumorales como el cáncer de mama o el cáncer de colon (Hou *et al.*, 2011; Greenhough *et al.*, 2010). En el cáncer de colon su expresión se ve incrementada un 80% (Eberhart *et al.*, 1994). Se ha descrito que fármacos inhibidores específicos de COX2 disminuyen la incidencia del cáncer de colon (Gupta & DuBois, 2001; Sheehan *et al.*, 1999). El efecto pro-tumoral de COX2 está mediado por su principal producto metabólico, la prostaglandina 2 (PGE₂), observándose elevados niveles de ésta en el cáncer de colon (Greenhough *et al.*, 2009). COX2 participa en el desarrollo tumoral promoviendo angiogénesis mediante la inducción de factores como VEGF o incrementando la invasión tisular y la metástasis de las células tumorales (Greenhough *et al.*, 2009; Tessner *et al.*, 2004; Pozzi *et al.*, 2004; Tsujii *et al.*, 1998). La PGE₂ también participa en la tumorigénesis, promoviendo supervivencia y proliferación celular. Ambos procesos mediados por la activación de la ruta de β -catenina, por reducción en la expresión de la IL12, con actividad anti-tumoral, y por el aumento de la expresión de IL23, con actividad pro-tumoral (Khayrullina *et al.*, 2008; Castellone *et al.*, 2005).

3. Familia de las MAPKs.

Las células de un organismo deben responder constantemente a cambios, tanto físicos como químicos, del ambiente que les rodea. Así pueden mantener la homeostasis y el buen estado de dicho organismo (Risco & Cuenda, 2012). Para poder adaptarse a estos cambios, una de las vías de transducción de señales más extendida en las células eucariotas es la vía de las MAPKs (Kyriakis & Avruch, 2001). Las MAPKs, en mamíferos, pueden ser activadas por un gran número de estímulos extracelulares, los cuales son reconocidos por una amplia variedad de receptores (Cohen, 1997). Estos estímulos se pueden agrupar en estímulos de estrés ambiental, como la isquemia; la radiación ionizante; el estrés osmótico o la presencia de especies reactivas del oxígeno o estímulos mediados por moléculas extracelulares, que son reconocidas por una amplia variedad de receptores de membrana como pueden ser receptores de citoquinas (IL1 o TNF α); receptores de factores de crecimiento (EGF); receptores de hormonas (insulina); receptores trans-membrana acoplados a proteínas G (TGF β) (Cuenda & Rousseau, 2007). La activación de las MAPKs comporta, en último término, una coordinación en la activación de la transcripción de genes, la síntesis de proteínas, la maquinaria del ciclo celular, la muerte y la diferenciación celular (Cohen, 2002). Por lo tanto, la regulación de estas quinasas es muy importante para la capacidad de adaptación de las células al medio circundante, modulando las respuestas fisiológicas (Kyriakis & Avruch, 2001).

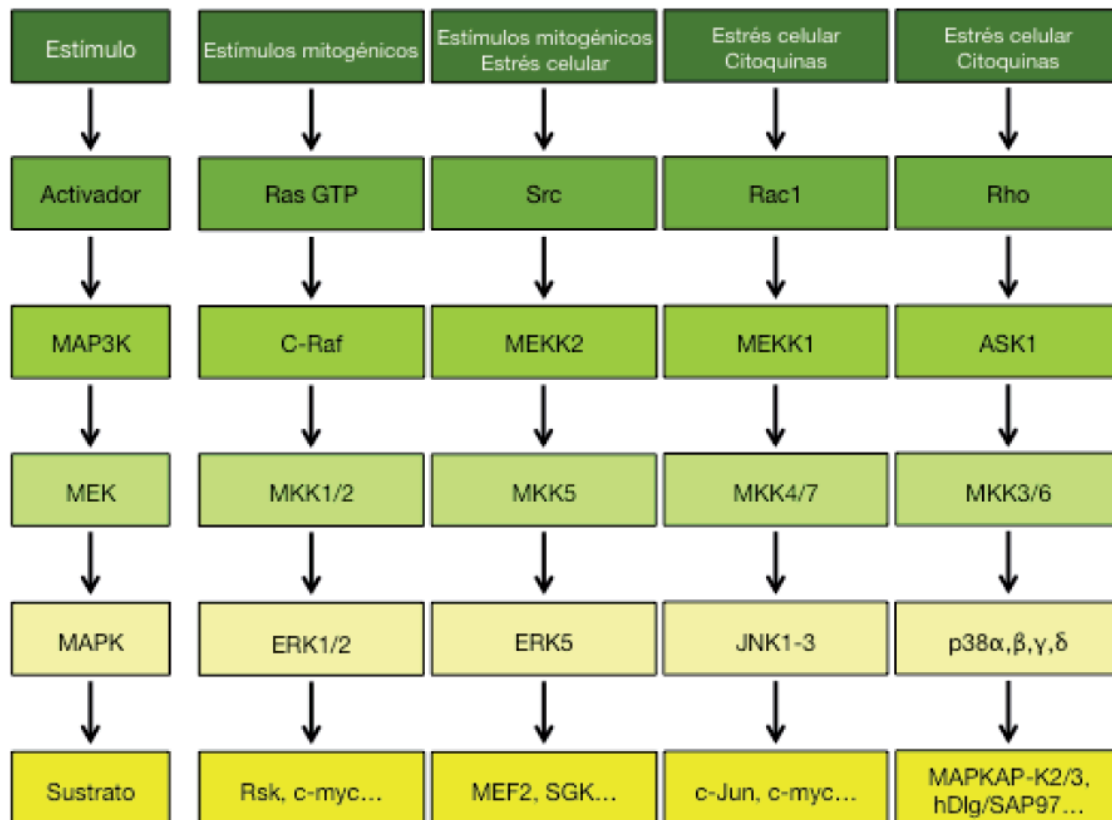


Fig. I-12. Cascada de señalización de las MAPKs.

Las MAPKs son una familia de quinasas que se caracterizan por estar integradas en una cascada de señalización modular dividida en tres niveles (Fig. I-12). Son activadas por fosforilación en treonina y tirosina mediada por las MEKs o MKKs, en el motivo altamente conservado Thr-X-Tyr. Este motivo se localiza en el lazo de activación del dominio quinasa VIII. A su vez, las MEKs son activadas por fosforilación en serina/treonina por las MAP3Ks. Al mismo tiempo, todos los elementos que componen las diferentes rutas pueden ser regulados por otras quinasas, haciendo que puedan ser controladas por una amplia variedad de activadores e inhibidores (Kyriakis & Avruch, 2001).

Las MAPKs pueden dividirse en cuatro subfamilias: ERK1/2, ERK5, JNK y p38MAPK. Estas subfamilias pueden desempeñar funciones fisiológicas diferentes, tener diferentes sustratos y ser activadas por diferentes estímulos, pero todas ellas presentan características comunes (Kyriakis & Avruch, 2001).

Las ERK1 y ERK2, en mamíferos, presentan un grado de homología del 83% y se expresan ubicuamente (Boulton & Cobb, 1991). Son quinasas que se activan principalmente frente a estímulos mitogénicos y factores de crecimiento. Entre sus sustratos encontramos proteínas de membrana, factores de transcripción, proteínas de citoesqueleto u otras quinasas (Roux & Blenis, 2004). Promueven proliferación, división y supervivencia celular (Junttila *et al.*, 2008). Debido a la gran cantidad y variedad de sustratos, se las ha relacionado con diversas enfermedades tales como cáncer, procesos inflamatorios, diabetes, enfermedades neurodegenerativas u obesidad (Lawrence *et al.*, 2008).

Las JNKs presentan un grado de homología entorno al 85% entre sí. JNK1 y JNK2 se distribuyen de forma ubicua y JNK3 aparece preferentemente en cerebro (Chen *et al.*, 2001). Se activan fundamentalmente en respuesta a estímulos de estrés celular como irradiación, choque térmico o daños del DNA, y citoquinas pro-inflamatorias (Junttila *et al.*, 2008). Sus sustratos clásicos son factores de transcripción como c-Jun, aunque también actúan sobre proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL, implicadas en procesos anti-

apoptóticos (Raman *et al.*, 2007). En función del estímulo, así como del tipo celular, se ha descrito que las JNKs participan en procesos como apoptosis, proliferación y supervivencia celular (Junttila *et al.*, 2008).

La ERK5 es la MAPK más grande que se ha descrito hasta ahora, con un tamaño de unos 100 kDa (Chen *et al.*, 2001). Se activa principalmente en respuesta a estímulos de estrés celular, así como por estímulos mitogénicos (Cohen, 1997). Presenta entre sus sustratos factores de transcripción como c-myc o c-fos y otras proteínas como SGK y SAP97/hDlg, participando en la regulación de la proliferación y la supervivencia celular (Iñesta-Vaquera *et al.*, 2010; Mody *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001).

3.1. p38MAPK.

3.1.1. Identificación: isoformas.

La subfamilia p38MAPK está constituida por cuatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . La isoforma p38 α fue la primera en ser identificada en 1994 por cuatro grupos independientemente (Han *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Freshney *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Originariamente se describió como un polipéptido de 38 kDa de peso molecular que se fosforilaba en una tirosina en respuesta a una endotoxina, choque osmótico y citoquinas. Posteriormente, se describieron tres isoformas más: p38 β (Enslen *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1996), p38 γ (Lechner *et al.*, 1996; Mertens *et al.*, 1996) y p38 δ (Goedert, Cuenda *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997). Las cuatro isoformas se expresan en todos los tejidos, aunque p38 γ es más abundante en músculo esquelético y p38 δ en testículo, páncreas, riñón e intestino delgado (Cuenda & Rousseau, 2007).

Los cuatro miembros que forman esta familia pueden subdividirse en dos grupos, uno formado por p38 α y p38 β , y el otro constituido por p38 γ y p38 δ . Los criterios de agrupación son tres:

- Homología de secuencia: p38 α y p38 β son homólogas en un 75%, y p38 γ y p38 δ son homólogas en un 70%. Mientras que la homología entre p38 α y p38 γ , y p38 α y p38 δ es del 62% y el 61% respectivamente (Iñesta-Vaquera *et al.*, 2008).
- Susceptibilidad a sustancias inhibitoras: p38 α y p38 β son inhibidas por el compuesto SB203580, mientras que p38 γ y p38 δ no (Cuenda *et al.*, 1997; Goedert, Cuenda, *et al.*, 1997). Sin embargo, todas las isoformas son inhibidas por el compuesto BIRB0796, aunque su inhibición es dependiente de la concentración del mismo (Kuma *et al.*, 2005).
- Selectividad de sustratos: p38 α y p38 β se unen con mayor afinidad a la proteína glucógeno sintasa, MAPKAP-K2 y MAPKAP-K3 (Cuenda & Rousseau, 2007). Mientras que p38 γ y p38 δ presentan mayor afinidad de unión a proteínas “scaffold”. También se ha descrito que la proteína *Tau*, que se asocia a microtúbulos, se une con mayor afinidad a p38 γ y p38 δ que a p38 α y p38 β (Risco & Cuenda, 2012; Iñesta-Vaquera *et al.*, 2008).

3.1.2. Activación.

En general, las p38MAPKs están fuertemente activadas por estrés ambiental y celular, así como por citoquinas. Por el contrario, son muy poco susceptibles de ser activadas por suero y factores de crecimiento (Cuenda & Rousseau, 2007; Kuma *et al.*, 2004; Goedert, Cuenda *et al.*, 1997). Esta activación se da por una doble fosforilación en el motivo Thr-Gly-Tyr de su lazo de activación, por acción de las quinasas MKK3 y MKK6 (Cuenda & Rousseau, 2007). Tanto MKK3 como MKK6 son muy específicas en su fosforilación y sólo actúan sobre las p38MAPK, no

activan ni a las JNKs ni a las ERK1/2 (Cuenda *et al.*, 1996; Raingeaud *et al.*, 1996; Derijard *et al.*, 1995). Utilizando células deficientes en MKK3 y MKK6, se ha demostrado que estas dos quinasas son esenciales para la activación de p38 α en respuesta a TNF α . Sin embargo, en respuesta a la luz ultravioleta, p38 α puede ser activada por otra MEK, MKK4, que también activa JNKs (Brancho *et al.*, 2003). Utilizando también células deficientes en MKK3 y MKK6, se ha observado que ambas MKKs son esenciales en la activación de p38 γ y p38 δ frente a estímulos ambientales y citoquinas. Siendo MKK6 el principal mediador de la activación de p38 γ y MKK3 el de p38 δ (Remy *et al.*, 2009).

MKK3 y MKK6 van a ser activadas a su vez por una MAP3K, que varía en función del tipo celular y del estímulo que las active (Cuenda & Rousseau, 2007). Se han descrito diferentes MAP3Ks que activan a las p38MAPKs como MLKs, ASK1 y TAK1 (Cheung *et al.*, 2003; Gallo & Johnson, 2002; Kyriakis & Avruch, 2001; Yamaguchi *et al.*, 1995). A su vez estas MAP3Ks están activadas por moléculas que forman parte de la subfamilia de Rho como Rac1 o Rit (Sakabe *et al.*, 2002; Marinissen *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1995), así como receptores acoplados a proteínas G heterodiméricas (Marinissen *et al.*, 1999).

3.1.3. Sustratos y funciones.

Hasta la fecha, se han descrito una gran variedad de sustratos para las p38MAPK. Estos sustratos pueden localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, poniendo de manifiesto la amplia variedad de funciones celulares que pueden desempeñar (Cuenda & Rousseau, 2007).

Como mencionamos en el apartado 3.1.1. de la Introducción, las p38MAPKs se pueden dividir en dos grupos en función de su capacidad para interaccionar de forma específica con unos u otros sustratos. Dentro del grupo que forman p38 α y p38 β , podemos encontrar entre sus sustratos, factores de transcripción (MEF2, SAP1, ATF2) y otras proteínas quinasas como MAPKAP-K2 y MAPKAP-K3, cuya activación provoca la fosforilación de factores de transcripción y regulan la estabilidad del mRNA de determinadas proteínas; MNKs, que participan en proliferación y crecimiento celular o MSK1/2 que actúan sobre la transcripción génica (Cuenda & Rousseau, 2007). En los últimos años se ha descrito la participación de p38 α en la inhibición de GSK3 β mediante su fosforilación en determinados tejidos (cerebro) o células (timocitos) (Thornton *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, p38 β regula la actividad de GSK3 β indirectamente, actuando como quinasa cebadora al fosforilar a la glucógeno sintasa (Kuma *et al.*, 2004).

En los últimos años se han descrito varios sustratos para el grupo constituido por p38 γ y p38 δ . p38 γ posee una característica que la hace única respecto al resto de p38MAPK, ya que presenta en su extremo C-terminal una secuencia de unión a dominios PDZ. Esta característica ha contribuido a identificar sustratos para esta quinasa como la α 1-sintrofina, interaccionando con ella a través de su dominio PDZ y fosforilándola (Hasegawa *et al.*, 1999). También interacciona con los dominios PDZ1 y PDZ3 de hDlg/SAP97 y la fosforila. Al fosforilar a hDlg/SAP97 hace que se disocie del citoesqueleto (Sabio *et al.*, 2005). Además, se ha descrito su interacción con la proteína SAP90/PSD95, a través del dominio PDZ3 (Sabio *et al.*, 2004). Aunque p38 γ también presenta sustratos que no poseen dominios PDZ, como la proteína mitocondrial Sap (Court *et al.*, 2004) o el factor de transcripción MyoD (Gillespie *et al.*, 2009). En el caso de p38 δ se ha visto que fosforila a *Tau*, una proteína neuronal que está asociada a microtúbulos (Yoshida & Goedert, 2006; Feijoo *et al.*, 2005; Goedert, Hasegawa *et al.*, 1997), así como con la proteína “*stathmin*”, que también interacciona con microtúbulos (Parker *et al.*, 1998). Esto

pone de manifiesto la posible implicación de p38 δ en la regulación de la dinámica de microtúbulos. Otro sustrato sobre el que actúa p38 δ fosforilándolo e inactivándolo es el factor de elongación eucariótico 2 (eEF2) (Knebel *et al.*, 2002; Knebel *et al.*, 2001). Se ha descrito recientemente que p38 δ puede también interaccionar y fosforilar a PKD1, sugiriendo su participación en la regulación de la secreción de insulina por las células β del páncreas (Sumara *et al.*, 2009).

3.1.4. Papel de las p38MAPKs en patologías.

Cada vez existen más evidencias de la importante función que desempeñan las p38MAPK en procesos patológicos, contribuyendo a considerar a esta subfamilia de las MAPKs como posibles dianas terapéuticas (Fig. I-13).

La implicación de p38 α en procesos inflamatorios está ampliamente descrita, participando en la regulación de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias anti-inflamatorias (Cuenda & Rosseau, 2007). p38 α puede regular la expresión de estas citoquinas a nivel transcripcional o post-transcripcional, regulando la estabilidad de los mRNA y la movilidad de las proteínas (Wagner & Nebreda, 2009; Karin, 2006). La producción de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente TNF α , IL1 β e IL6, desempeña un papel crucial en el desarrollo de enfermedades como artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la psoriasis (Cuenda & Rousseau, 2007). También se ha descrito la participación de p38 α en procesos como proliferación (Thornton & Rincon, 2009; Halawani *et al.*, 2004; Ambrosino & Nebreda, 2001), supervivencia (Aguirre-Ghiso, 2007; Comes *et al.*, 2007), diferenciación (Cuadrado & Nebreda, 2010; Ventura *et al.*, 2007; Cuenda & Rousseau, 2007; Schmelter *et al.*, 2006), migración y metástasis (Rousseau *et al.*, 2006; Hiratsuka *et al.*, 2006; McMullen *et al.*, 2005). Todos estos procesos son característicos en el desarrollo del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por otro lado, también se ha descrito la participación de las isoformas p38 γ y p38 δ en procesos como proliferación, ciclo celular y apoptosis, controlando el desarrollo tumoral. Así como en enfermedades metabólicas y regeneración tisular (Risco & Cuenda, 2012; Cuadrado & Nebreda, 2010; Cuenda & Rousseau, 2007).

En el caso de p38 γ se ha observado un comportamiento dual en función del tipo celular o del modelo experimental (Risco & Cuenda, 2012). Por un lado, se ha descrito un efecto pro-tumoral en células epiteliales de intestino de rata y en cáncer de mama humano, donde se ha visto un incremento de p38 γ en la transformación celular inducida por Ras (Tang, Qi *et al.*, 2005; Loesch & Chen, 2008). Por el contrario, se ha descrito un efecto anti-tumoral en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) deficientes en p38 γ , que presentan un incremento en la migración celular y en la secreción de la metaloproteinasa MMP2 (Cerezo-Guisado *et al.*, 2011). En este mismo estudio, se ha descrito, tanto *in vivo* como *in vitro*, que MEF re-transformadas con K-Ras y carentes en p38 γ promueven un incremento en la proliferación celular y la tumorigénesis. También se ha descrito la participación de esta isoforma en procesos de diferenciación de músculo esquelético, participando en la regeneración muscular en adultos (Cuadrado & Nebreda, 2010; Gillespie *et al.*, 2009).

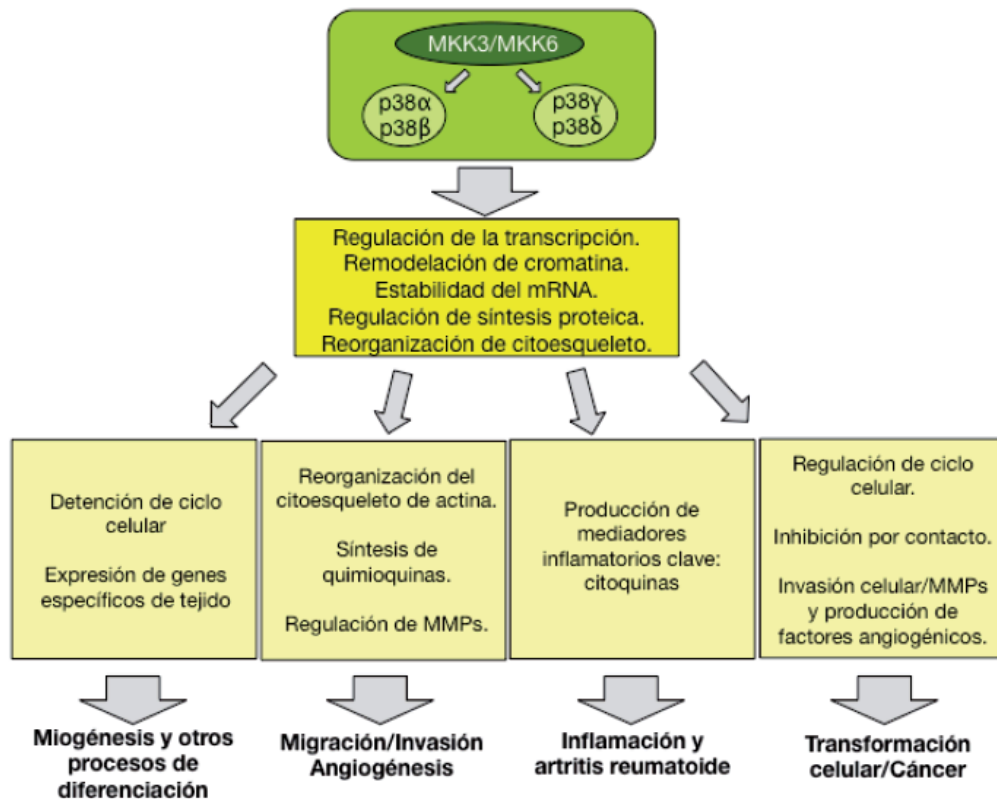


Fig. I-13. Funciones fisiológicas e implicaciones patológicas de las rutas de señalización de las p38MAPKs. (Figura adaptada de Cuenda & Rousseau, 2007).

En cuanto a la participación de p38δ en procesos tumorales, se ha descrito que esta quinasa promueve la aparición de carcinoma de piel, mediante la regulación de la proliferación celular y la invasión (Junttila *et al.*, 2007, Schindler *et al.*, 2009). También participa en procesos como la diabetes, en donde p38δ podría jugar un papel importante en el control de la regulación de la secreción de insulina, así como la muerte de las células β (Sumara *et al.*, 2009); o la psoriasis, participando en el proceso de diferenciación de los queratinocitos, regulando la expresión de involucrina, proteína que se expresa durante la diferenciación de dichas células (Eckert *et al.*, 2003).

Tanto p38γ como p38δ fosforilan a la proteína Tau en residuos que impiden el ensamblamiento de microtúbulos. Además, estos residuos se han encontrado fosforilados en Tau de pacientes con Alzheimer, lo que sugiere una implicación de ambas quinasa en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como dicha enfermedad (Cuenda & Rousseau, 2007).

4. Modelos de CU y CAC en ratones.

4.1. Modelo de CU.

En las enfermedades inflamatorias, como la CU, participan un amplio número de factores, haciendo que sea un modelo altamente complejo. Estos factores se han dividido artificialmente en seis componentes: susceptibilidad genética, factores ambientales, inmunidad adquirida, inmunidad innata, inflamación no específica y cierre de herida. De éstos, los tres primeros estarían implicados en los primeros estadios de la enfermedad y los tres últimos, en rutas de inflamación tardía y reparación (Elson *et al.*, 1995).

El estudio de la CU, mediante el uso de animales de experimentación, permite mimetizar los síntomas y mecanismos implicados en la enfermedad en humanos. Uno de los modelos más utilizados es el tratamiento de ratones con sulfato sódico de dextrano (DSS) (Okayasu *et al.*, 1990). El DSS permite el análisis de factores ambientales implicados en CU, así como de la inmunidad innata e inespecífica. Aunque en menor medida, también facilita el estudio del proceso de reparación de las lesiones por el mecanismos de cierre de herida (Elson *et al.*, 1995).

No se conoce exactamente cómo funciona el DSS a la hora de desarrollar la CU. Si se sabe que participa, a nivel de las células epiteliales del colon, en procesos citotóxicos, interfiriendo en la correcta interacción entre: las células epiteliales, los linfocitos intra-epiteliales y proteínas de la matriz extracelular. También participa en la modulación de la expresión de receptores de membrana, alterando su función (Ni *et al.*, 1996). Por tanto, el DSS actuaría incrementando la permeabilidad de la mucosa, haciendo que se rompa la barrera funcional que ésta constituye e induciendo un proceso inflamatorio en la mucosa del colon (Kitajima *et al.*, 1999).

Se ha visto que mediante administración oral, disuelto en el agua, el DSS genera colitis aguda o crónica en los ratones (Okayasu *et al.*, 1990), pero su grado de actuación depende de varios factores:

- El peso molecular del DSS utilizado: este factor hace que la severidad, así que como la localización de las lesiones varíe. La utilización de DSS de peso molecular entorno a los 40 kD, provoca una inflamación severa, principalmente localizada en la zona distal del colon (Kitajima *et al.*, 2000).
- Diferente susceptibilidad al DSS en función de la cepa de ratón utilizada (Mähler *et al.*, 1998).
- La dosimetría y el tiempo de aplicación (Melgar *et al.*, 2005).

4.2. Modelo de CAC.

Para mimetizar en ratones los procesos que ocurren en el desarrollo del CAC en humanos, se utiliza el compuesto carcinogénico azoximetano (AOM). Este compuesto se combina con ciclos de agua con y sin DSS, simulando una colitis crónica (Okayasu *et al.*, 1996). Se ha observado que individuos con colitis ulcerosa crónica, presentan ciclos de enfermedad y recuperación. Esto provoca una constante alternancia entre procesos de reparación de la mucosa y procesos de destrucción de la misma. Estos ciclos hacen que aumente la susceptibilidad de la mucosa a desarrollar cáncer de colon (Okayasu *et al.*, 1996). Una única inyección de AOM es suficiente para desarrollar tumores de modo específico en el colon (Tanaka *et al.*, 2003). Además, éstos son similares a los adenomas desarrollados en humanos, apareciendo neoplasias a nivel de las criptas, restos de procesos apoptóticos, así como acumulación de células inflamatorias en la lámina propia (Boivin *et al.*, 2003).

El AOM actúa produciendo la aparición de focos de criptas aberrantes, que van degenerando hasta la aparición de adenomas y, finalmente, adenocarcinomas malignos (Takahashi & Wakabayashi, 2004). En la célula, este compuesto produce mutaciones del DNA, cambiando los nucleótidos G:C a A:T (Chen & Huang 2009). Pero no lo hace interaccionando directamente con el DNA, sino que debe ser activado previamente (Chen & Huang 2009). Para su activación, el AOM es hidroxilado por el citocromo P-450, concretamente por el CYP2E1, dando lugar a metilazoximetanol (MAM). El MAM se puede oxidar o decaer (sin participación del citocromo), dando lugar al ión metildiazodio, que actuará alquilando el DNA (Sohn *et al.*, 2001).

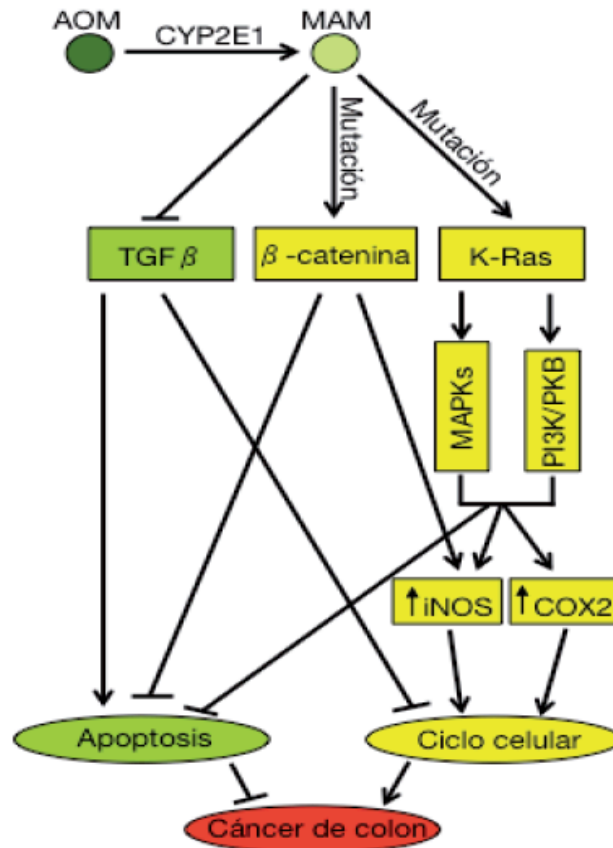


Fig. I-14. Mecanismos de acción del AOM y rutas que se ven comprometidas por su acción mutagénica. (Figura adaptada de Chen & Huang, 2009 y Takahashi & Wakabayashi, 2004).

El AOM provoca la aparición de cáncer de colon alterando tres rutas principalmente (Chen & Huang 2009):

- La ruta de K-Ras: provocando mutaciones puntuales en esta proteína, lo que hace que se active, activando a su vez las dos rutas que controla: la ruta PI3K/PKB y la ruta de las MAPKs, promoviendo carcinogénesis (Takahashi & Wakabayashi, 2004).
- La ruta de la β -catenina: provocando mutaciones en los residuos de β -catenina que son fosforilados por GSK3 β . Lo que conlleva una acumulación de la β -catenina, promoviendo carcinogénesis.
- La ruta de TGF β : se ve disminuida con el tratamiento de AOM, lo que hace que se pierda el efecto anti-tumoral de dicha ruta.

Las alteraciones mediadas por AOM en genes como K-Ras o β -catenina, también provocan anomalías en la expresión de proteínas como iNOS o COX2. Esto contribuye a la aparición de tumores en el colon (Takahashi & Wakabayashi, 2004) (Fig. I-14). El tratamiento con AOM es un modelo que mimetiza el cáncer de colon no hereditario. Por tanto, su histología es semejante al cáncer de colon esporádico que sufren los humanos en la parte distal del mismo (Bissahoyo *et al.*, 2005). Debido a que esta enfermedad es altamente dependiente de la susceptibilidad genética de cada individuo, hay que tener en cuenta a la hora de utilizar este modelo: la cepa de ratón utilizada para llevar a cabo el ensayo (Suzuki *et al.*, 2006) así como la dosis de AOM a utilizar (Bissahoyo *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

Hasta ahora, se ha descrito la participación de la isoforma p38 α en procesos inflamatorios, pero no la del resto de isoformas de las p38MAPKs. Sin embargo, cada vez hay más evidencias del papel desarrollado por p38 γ y p38 δ en procesos inflamatorios, como por ejemplo los mediados por LPS. También están apareciendo, en los últimos años, múltiples estudios sobre la participación de p38 γ y/o p38 δ en procesos relacionados con la formación y desarrollo de tumores, mediante la regulación de procesos como proliferación, apoptosis, diferenciación celular, ciclo celular, etc.

El objetivo general, de esta tesis doctoral, es analizar la participación de p38 γ y p38 δ en el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis y los procesos inflamatorios asociados a la colitis ulcerosa, mediante el uso de ratones deficientes en p38 γ y/o p38 δ .

Para poder alcanzar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

1.- Estudiar el fenotipo de ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y/o p38 $\delta^{-/-}$ a los que se les ha inducido CAC, mediante el análisis de procesos implicados en el desarrollo tumoral (proliferación y apoptosis), así como el estudio de moléculas y células implicadas en inflamación y tumorigénesis.

2.- Analizar el fenotipo de ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y/o p38 $\delta^{-/-}$ a los que se les ha inducido CU, mediante la valoración de proteínas (como citoquinas) y moléculas (como NF- κ B y STAT3) implicadas en inflamación, así como diversos tipos de células del sistema inmune.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tampones y reactivos.

1.1. Tampones

- Tampón de lisis: 50mM Tris/HCl pH 7.5, 1% Triton-X-100 (v/v), 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM fluoruro sódico (NaF), 10mM β -glicerofosfato sódico, 5mM pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), 1mM ortovanadato sódico (Na_3VO_4), 0.27M sacarosa. En el momento de uso, se añade 0.1% de β -mercaptoetanol (v/v) y el coctel de inhibidores de proteasas de Roche (*Complete protease inhibitor cocktail tablets*). El ortovanadato sódico se preparó disolviéndose en agua, sometiéndolo a varios ciclos de calentamiento (hasta ebullición) y enfriamiento (hasta temperatura ambiente) y ajustando el pH a 10. Estos ciclos se repitieron hasta la decoloración de la solución y se ajustó el pH nuevamente a 10. Este proceso hace que el ortovanadato sódico se despolarice y favorezca la inhibición de las enzimas tirosin-fosfatasas.
- Tampones para la extracción de proteínas de modo secuencial tipo *Kelmer*:
Tampón 1: 25mM Tris/HCl pH 7.5, 10mM cloruro sódico (NaCl), 1mM EGTA, 5mM cloruro de magnesio (MgCl_2), 10% NonidetP-40 (v/v), 1mM DTT, 10mM ortovanadato sódico (Na_3VO_4) y el coctel de inhibidores de proteasas de Roche.
Tampón RIPA: 25mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,1% SDS (w/v), 1% NonidetP-40 (v/v), 0,5% deoxicolato sódico ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$) (w/v), 1mM EGTA y 5mM pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$).
- Tampón de carga de electroforesis 5X: 250mM Tris/HCl pH 6.8, 10% SDS (w/v), 30% glicerol (v/v), 5% β -mercaptoetanol (v/v) y 0.02% azul de bromofenol (w/v).
- TBS/TBS-T: 50mM Tris/HCl pH 7.4 y 100mM NaCl. El TBS-T contiene además 0.05% de Tween20 (v/v).
- PBS: 137mM NaCl, 2.7mM cloruro potásico (KCl), 4.3mM fosfato sódico (Na_3PO_4) y 1.4mM bifosfato potásico (K_2HPO_4).
- Tampón de electroforesis 10x: 25mM de Tris/HCl pH 8.3, 0.1% SDS (w/v) y 195mM glicina.
- Tampón de transferencia 10x: 25mM Tris/HCl pH 8.3 y 195mM glicina. En el momento de uso se le añade un 20% de metanol (v/v).
- En la técnica de TUNEL se utilizaron los siguientes tampones:
Tampón TdT 5x: 125mM Tris/HCl pH8.8, 1.25mg/ml BSA, 1M cacodilato sódico dihidratado ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
Mezcla de reacción TdT: transferasa terminal recombinante (1200unidades) (Roche, *Terminal transferase, recombinant*), 2 μ l de *biotin-16-dUTP* (Roche), diluido en tampón TdT1x complementado con 1mM de cloruro de cobalto(II) (CoCl_2).

1.2. Reactivos

- En los contrastes histológicos se utilizó hematoxilina de Harris (Merck) 1:1 (v/v) en agua del grifo y eosina al 0,5% en solución alcohólica (v/v) (Merck).

- Los epítomos de las secciones histológicas incluidas en parafina se recuperaron mediante una solución de citrato sódico ($C_6H_5Na_3O_7$) 10mM pH 6 al que se le añade un 0.05% Tween 20 (v/v).
- El bloqueo de epítomos inespecíficos de los cortes histológicos se realizó con un 3% suero de cabra (v/v) y 0.25% Triton-X-100 (v/v) diluidos en PBS.
- Los núcleos celulares de las preparaciones histológicas se tiñeron con Hoechst 33342 (bisBenzimide H33342 trihydrochloride, Sigma-Aldrich).
- Se utilizaron dos medios de montaje: uno para las histoinmunofluorescencias, compuesto por glicerol y PBS (1:1, v/v) y otro para los contrastes histológicos con hematoxilina y eosina, en los que se usó *Eukitt® mounting medium* (Leica).
- Azoximetano (AOM): es un potente carcinógeno ($C_2H_6N_2O$) que inyectado en los ratones induce la aparición de cáncer de colon (Sigma-Aldrich, A2853).
- Sulfato sódico de dextrano (DSS) M.W.= 36,000-50,000: es una sustancia que promueve la inflamación de la mucosa del colon (MP Biomedicals, 160110).

2. Ratones.

Los ratones utilizados en esta tesis fueron generados al deleccionar los genes p38 γ , p38 δ o ambos, en ratones con fondo genético mixto C57BL/6, mediante recombinación homóloga. Como el gen de p38 γ se localiza en el cromosoma 22q y el de p38 δ en el 6p, esto permitió generar ratones deficientes en ambas proteínas, cruzando ratones carentes en p38 γ con ratones deficientes en p38 δ . (Sabio *et al.*, 2005).

Las colonias se mantuvieron libres de patógenos en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid (España). El manejo de los ratones se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos por la Unión Europea (86/609/EEC), revisados y aprobados por el Comité Institucional de Bienestar Animal del CNB.

3. Tratamientos realizados con ratones.

Todos los tratamientos descritos en esta sección se realizaron en ratones silvestres (wt), deficientes en p38 γ (p38 $\gamma^{-/-}$), en p38 δ (p38 $\delta^{-/-}$) y carentes en ambas proteínas (p38 $\gamma/\delta^{-/-}$).

3.1. Modelo de colitis ulcerosa (CU) en ratones.

El tratamiento se llevo a cabo tratando a ratones de entre 7 y 9 semanas de edad con un 3% de DSS (w/v) (apartado 1.2. de Materiales y métodos) disuelto en el agua de beber. En función del análisis a realizar posteriormente, los ratones se sacrificaron a diferentes tiempos (Fig. M-1.A):

- Valoración de los niveles de citoquinas secretadas por el colon: tras 5 días de tratamiento con DSS, hubo dos días de recuperación con agua normal y posteriormente, los animales fueron sacrificados con CO₂.
- Valoración del grado de apoptosis: los animales fueron sacrificados a los 2 y 4 días del inicio del tratamiento con DSS.
- Valoración del proceso de colitis ulcerosa y recuperación del mismo: los ratones fueron tratados durante 5 días con DSS disuelto en el agua y a continuación, se les administró agua sin DSS durante 5, 10 y 15 días (fase de recuperación).

3.2. Modelo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) en ratones.

Ratones de entre 7 y 9 semanas de edad fueron tratados con 10mg/kg de AOM (apartado 1.2. de Materiales y métodos) mediante inyección intra-peritoneal. En el caso de los animales control, en lugar de AOM se les inyectó PBS, solución en la que iba disuelto el producto. Tras cinco días de recuperación, se les administró un 2% de DSS (w/v) en el agua para beber durante 5 días, y a continuación, dos semanas de recuperación, con ingesta de agua sin DSS. Este ciclo, DSS y agua sin tratamiento, se repitió tres veces (Fig. M-1.B). Tras los tres ciclos de tratamiento, se observó la aparición de tumores en el colon de los animales.

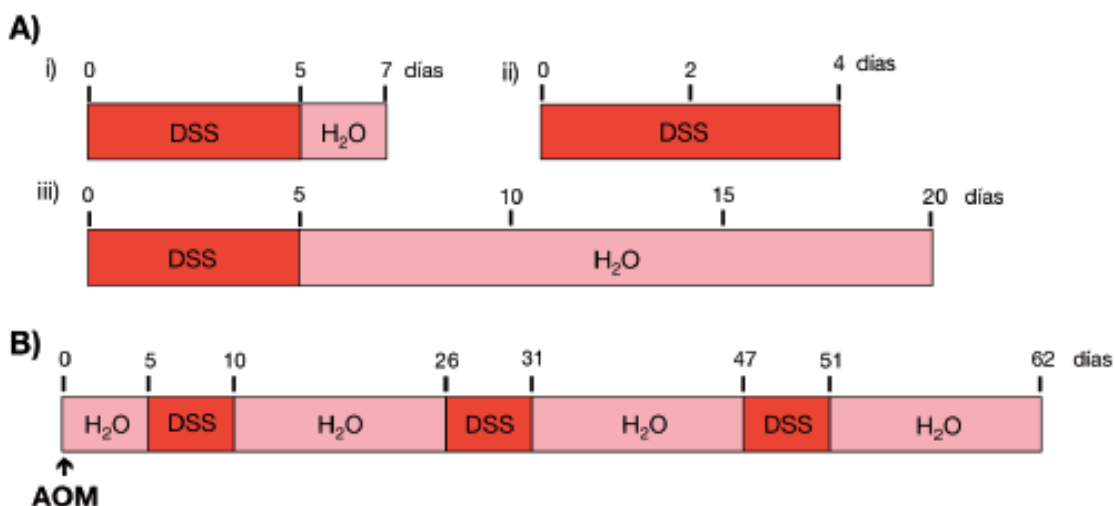


Fig. M-1. Esquemas de la línea del tiempo de los modelos CU (A) y CAC (B) en ratones. Para la valoración de (i) la secreción de citoquinas, (ii) la apoptosis celular y (iii) el proceso inflamatorio asociado a la colitis y su posterior recuperación.

3.3. Valoración y seguimiento de los tratamientos.

En todos los experimentos realizados, se hizo un seguimiento tanto del peso de los ratones (antes y después de cada tratamiento), como de la longitud del colon (tanto de los ratones tratados como los ratones control). También se valoró la mortalidad de los ratones en el modelo de CAC.

En el caso del modelo de CU, la valoración histopatológica de las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de los animales tratados y los controles, se hizo siguiendo dos escalas semi-cuantitativas descritas en Neurath *et al.*, 2002. Una escalada para valorar el grado de inflamación epitelial desde 0 a 4: 0= no hay evidencias de inflamación, 1= bajo nivel de inflamación con infiltración dispersa de células mononucleares, 2= inflamación moderada con múltiples focos, 3= alto nivel de inflamación con incremento de la densidad vascular y marcado adelgazamiento de la pared y 4= inflamación altamente severa, con infiltración trans-mural de leucocitos y pérdida de células caliciformes. Otra escala para valorar el grado de daño epitelial desde 0 a 4: 0= no hay evidencias de daño epitelial, 1= lesiones epiteliales ocasionales, 2= 1-2 focos de ulceración, 3= menos de 5 focos de ulceración, 4= más de 5 focos de ulceración.

Todos los tumores y úlceras encontrados en la valoración histopatológica de las secciones teñidas con H&E fueron medidos en superficie.

4. Procesamiento histológico de las muestras de colon.

4.1. Embebido en parafina de las muestras de colon.

Tras los diferentes tratamientos, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y se extrajo el colon. Éste se abrió longitudinalmente y se limpió, eliminando todos los restos de heces que hubiese. A continuación, se fijó con formalina 10% durante 24 horas, se enrolló sobre sí mismo (desde la parte distal a la proximal) y se procesó mediante inclusión en parafina en el procesador automático de tejidos TP1020 (Leica). Se siguió un proceso de deshidratación pasando por diferentes baños de 2 horas de duración cada uno (etanol 70% (v/v), etanol 80% (v/v), etanol 90% (v/v), etanol absoluto, xilol, parafina), hasta quedar totalmente incluido en parafina. Una vez incluidas las muestras en parafina se hicieron los bloques en la estación de montaje EG1130 (Leica) y se realizaron cortes seriados de 5µm de grosor con el microtomo HM310 (*Micron International*), hasta cortar el colon completo (todo el bloque).

4.2. Tinciones histológicas.

4.2.1. Contrastes con H&E.

Se hicieron tinciones con H&E (apartado 1.2. de Materiales y métodos) en secciones tomadas cada 200µm, a lo largo de todo el colon.

Se desparafinaron las muestras mediante baños sucesivos en diferentes sustancias: xilol (2 veces (2x) 15 min), etanol absoluto (6 min), etanol 96% (v/v) (7 min) y agua (2x3 min), hasta re-hidratar completamente las muestras. A continuación, se pasaron a un baño de hematoxilina durante 2 min, para teñir los núcleos celulares. Se lavó el exceso de tinte con agua caliente, aproximadamente 40°C, durante 10 min. Tras lo cual, se pusieron las muestras en un baño con eosina durante 2 min, para teñir los citoplasmas celulares.

Se deshidrataron las muestras nuevamente baños sucesivos en etanol 96% (v/v) (5 min), etanol absoluto (5 min) y xilol (2x1 min). Finalmente, las tinciones se montaron con medio de montaje (apartado 1.2.) y se les colocó un cubre.

En las valoraciones histopatológicas se utilizó un microscopio de campo claro Eclipse E600 (Nikon) y una lupa MZ APO (Leica) con cámara incorporada (Leica). Para la captura de las imágenes se usó el software QWin (Leica).

4.2.2. Histoinmunofluorescencia.

Se desparafinaron las secciones histológicas mediante una serie de baños sucesivos en xilol (3x5 min), etanol absoluto (2x5 min), etanol 95% (v/v) (2x5 min), etanol 70% (v/v) (2x2 min), etanol 50% (v/v) (2x2 min), agua MilliQ (2 min) y PBS (5 min).

A continuación, se realizó una recuperación de los epítomos mediante calor. Los cristales se pusieron en un baño con una solución de citrato sódico (apartado 1.2. de Materiales y métodos) y se calentaron durante 5 min a 700w en un microondas. Tras dejar enfriar los cristales, se realizó un pre-tratamiento con un anticuerpo anti-inmunoglobulina G (IgG), para evitar interacciones inespecíficas del anticuerpo secundario. En nuestro caso, sólo se realizó el pre-tratamiento en las secciones donde se utilizó como anticuerpo secundario un anti-ratón. El pre-tratamiento consistió en incubar las muestras durante 15 min a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón diluido 1/750 (v/v) en solución de bloqueo (apartado 1.2. de Materiales y métodos). Posteriormente se lavaron las muestras con PBS para retirar el anti-IgG sobrante.

Las muestras se bloquearon con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario específico disuelto en solución de bloqueo, a la concentración correspondiente (Tabla M-1), durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda y oscura. Al día

siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario indicado, disuelto en solución de bloqueo durante 1,5 horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura. El exceso de anticuerpo se lavó con PBS y se procedió a hacer una tinción de núcleo con el tinte vital Hoechst 33342 (10mg/ml) (apartado 1.2. de Materiales y métodos) disuelto en solución de bloqueo durante 10 min, en cámara húmeda y oscura. El exceso de tinte se lavó con PBS y se montaron las preparaciones con medio de montaje (apartado 1.2. de Materiales y métodos) y un cubre para su posterior valoración por microscopía confocal. Los controles negativos de anticuerpo secundario, para eliminar la señal inespecífica, se realizaron siguiendo el mismo protocolo ya descrito, pero variando el paso en que se incubaron las muestras con el anticuerpo primario. En su lugar, se incubaron las muestras con solución de bloqueo, no conteniendo el anticuerpo primario.

Todos los anticuerpos secundarios (Jackson) utilizados presentaban unido un marcador fluorescente de tipo Alexa, concretamente Alexa 647, que absorbe luz en una longitud de onda de 647nm y emite en una longitud de onda de 670nm, en el rango del rojo lejano. Por este motivo hemos utilizado un microscopio confocal espectral TCS SP5 (Leica). Las condiciones de adquisición de las imágenes no han sido de máxima confocalidad, ya que se ha recogido la luz emitida de varios planos en la misma imagen, para no perder información. La adquisición de todas las fotografías con el microscopio confocal TCS SP5 (Leica) fueron llevadas a cabo por el servicio de microscopía confocal del CNB.

5. Obtención de proteínas y RNA a partir de tejido de colon.

El colon limpio de heces se congeló y se pulverizó con un mortero de laboratorio. El tejido se mantuvo congelado con nitrógeno líquido durante todo el proceso. A continuación, la muestra resultante se dividió en dos, una parte para la obtención de proteínas y su posterior valoración por “western blot” (WB) y otra parte para la extracción de RNA y su posterior valoración por qRT-PCR.

5.1. Obtención de proteínas.

Las muestras generadas se lisaron añadiendo dos volúmenes de tampón de lisis (apartado 1.1. de Materiales y métodos) por volumen de muestra. Se homogenizó por agitación y se dejó durante 5 min a 4°C. A continuación, las muestras se centrifugaron en una centrifuga de mesa refrigerada (4°C) durante 15 min a 14000 r.p.m. (Mikron 200R de *Hettich zentrifugen*). Se recogió el sobrenadante, donde se encontraba el extracto proteico, y se descartó el “*pellet*”, donde quedan los restos celulares y el DNA. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

Para determinar la concentración de proteínas en el extracto obtenido, se utilizó el método colorimétrico de Bradford, en el que se mide la absorbancia de una muestra utilizando el reactivo de Coomassie (Pierce). La concentración de la muestra se determina extrapolando los valores de absorbancia en una recta patrón. Ésta se construye con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA). Para calcular la absorbancia de cada muestra, se tomó 1µl de la muestra disuelto en 100µl de agua destilada y se añadió 1ml de reactivo de Coomassie. A continuación, se midió la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro Genesys6 (*Thermospectromic*). Se hicieron dos mediciones independientes de cada muestra.

5.2. Aislamiento de RNA total.

La extracción del RNA se hizo a partir de muestras de colon obtenidas tras los diferentes tratamientos. Todo el proceso se llevó a cabo con material y agua libre de RNasas.

A las muestras se les añadió 1ml de Tri Reagent (Sigma), se homogenizaron por agitación y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200µl de cloroformo (Merck) a cada muestra, los tubos se agitaron suavemente y se dejaron durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 15 min a 14000 r.p.m. y a 4°C en una centrifuga de mesa refrigerada 5804R (*Eppendorf*). Tras lo cual, se recogieron las fases acuosas.

Sobre estas fases acuosas se añadieron 500µl de isopropanol (Merck). Los tubos se voltearon 10 veces, dejándolos a -20°C un mínimo de 2 horas. Las muestras se centrifugaron en la centrífuga de mesa refrigerada durante 15 min a 14000 r.p.m. y a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Sobre los “*pellets*” se añadieron 200µl de etanol al 70% (v/v). Las muestras se centrifugaron de nuevo durante 5 min a 13000 r.p.m. y a 4°C, tras lo cual se desechó el máximo sobrenadante posible. Por último, al quedar restos de etanol 70% en las muestras, se utilizó un concentrador de muestras (*Integrated speedvac system ISS110, Savant*) para eliminarlo. Finalmente, se resuspendió el RNA obtenido en un volumen de 50µl de agua y se almacenó a -80°C. La cuantificación de la concentración del RNA aislado se realizó con el espectrofotómetro ND1000 (*Thermoscientific Nanodrop*).

6. Disgregación de colon.

6.1. Obtención de criptas.

El colon se abrió longitudinalmente y se limpiaron los restos de heces. Los tejidos se mantuvieron en HBSS frío durante el tiempo que duró la extracción de todas las muestras (15-20 min). Posteriormente, se incubaron durante 15 min, a temperatura ambiente, en HBSS suplementado con 100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomicina.

A continuación, se cortó el colon en pequeños trozos con un bisturí y se incubó en HBSS complementado con 8mM EDTA durante 15 min a 37°C. Tras lo cual, se retiró el HBSS+EDTA y se añadió HBSS frío. Se agitó enérgicamente para desprender las criptas del epitelio del colon y se dejó decantar durante 1 min aproximadamente. Para comprobar que las criptas se separaban, se tomó una alícuota de 20µl del sobrenadante de decantación y se observó la presencia de criptas mediante un microscopio de campo claro (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Este proceso se repitió durante al menos cuatro veces más, hasta desprender la casi totalidad de las criptas. Los sobrenadantes de la decantación se recogieron y se centrifugaron en una centrífuga de mesa refrigerada (4°C) durante 15 min a 1500 r.p.m. (Mikron 200R de *Hettich zentrifugen*). A continuación, se descartó el sobrenadante y se recogieron los “*pellets*”, donde se localizaban las criptas del epitelio del colon.

6.2. Fraccionamiento celular tipo *Kelmer*.

Las criptas obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito, se lisaron de manera secuencial mediante choque hipotónico y detergentes. Así se obtuvieron por separado las proteínas procedentes del citoplasma y por otro lado las del núcleo celular.

Las criptas se incubaron con 500µl de tampón 1 (apartado 1.1. de Materiales y métodos) a 4°C durante 30 min, para que se diese la lisis celular, tras lo cual se centrifugaron en una centrífuga de mesa refrigerada (4°C) (Mikron 200R de *Hettich zentrifugen*) durante 15 min a 12000 r.p.m. Se recogió el sobrenadante, donde se

localizan las proteínas citosólicas y en el “*pellet*” quedan los restos celulares. Este “*pellet*” se incubó con 100µl de tampón RIPA (apartado 1.1. de Materiales y métodos). La mezcla se homogenizó con una aguja fina (25G 5/8”, *BD Microlance™*) y el homogenizado se centrifugó durante 10 min a 14000 r.p.m. y a 4°C en la centrífuga de mesa refrigerada. En el sobrenadante resultante obtuvimos las proteínas procedentes de la fracción nuclear. En la figura M-2 se muestra el control de la fragmentación hecho mediante WB.

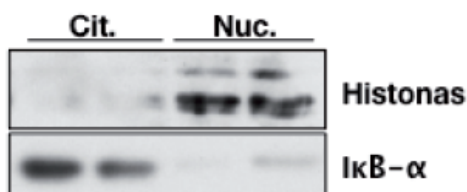


Fig. M-2. Control del fraccionamiento celular mediante WB. Se valoraron por WB, en células epiteliales de colon, la presencia de histonas, como control de la fracción nuclear, y de IκB-α, como control de la fracción citoplasmática.

7. Inmunoprecipitación de proteínas.

Mediante la inmunoprecipitación obtenemos muestras enriquecidas en la proteína de interés. En el proceso se utilizó la proteína G-sefarosa (*Protein G sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare*), que se mantiene en etanol al 20% y a 4°C, por lo que previamente hay que equilibrarla en PBS. A continuación, se acopló el anticuerpo que reacciona con la proteína de interés (2µg por muestra) a la proteína G-sefarosa (10µl por muestra), mediante una incubación de 30 min, a 4°C y en agitación. Posteriormente, se eliminó el exceso de anticuerpo con dos lavados con PBS. Seguidamente, se añadieron las muestras y se incubaron durante 2 horas, a 4°C y en agitación. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 1 min, a 13000 r.p.m. y a 4°C, en la centrífuga de mesa refrigerada. El “*pellet*” resultante se lavó dos veces en tampón de lisis que además contenía 0.5M de NaCl y otros dos lavados con tampón de lisis sin sal.

Para analizar las muestras por WB, se añadió tampón de carga 5x y las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 90°C. Este paso hace que las proteínas se separen de la matriz de G-sefarosa. Finalmente, las muestras se centrifugaron y se sometieron a electroforesis.

Antígeno	Procedencia	Nº de catálogo	Concentración	IgG
p-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	9211	WB: 1/1000	Conejo
p38 α	Santa Cruz	sc-535	WB: 1/2000	Conejo
p38 β	Zymed	33-8700	WB: 1/500	Ratón
p38 γ	DSTT	-	WB: 1 μ g/ml	Oveja
p38 δ	DSTT	-	WB: 1 μ g/ml	Oveja
p-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	44682	WB: 1/1000	Conejo
JNK	Cell Signaling	9252	WB: 1/1000	Conejo
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	9101	WB: 1/1000	Conejo
ERK1/2	Cell Signaling	9102	WB: 1/1000	Conejo
β Catenina	Millipore	MAB2081	WB: 0.06 μ g/ml HI: 1/200	Ratón
p-STAT3 (Tyr705)	Cell Signaling	9145	WB: 1/1000	Conejo
STAT3	Santa Cruz	sc-482	WB: 1/1000	Conejo
p-GSK3 α/β (Ser9/21)	Cell Signaling	9331	WB: 1/1000	Conejo
GSK3 α/β	Cell Signaling	5676	WB: 1/1000	Conejo
pPKB (Ser473)	Cell Signaling	9271	WB: 1/1000	Conejo
PKB	Cell Signaling	9272	WB: 1/1000	Conejo
I κ B- α	Cell Signaling	9242	WB: 1/1000	Conejo
COX2	Cayman	160126	WB: 1/1000 HI: 1/200	Conejo
MMP9	GeneTex®	GTX23159	WB: 1/1000 HI: 1/100	Ratón
F4/80	AbD Serotec	MCA497GA	HI: 1/100	Rata
Gr1	AbD Serotec	MCA2387GA	HI: 1/100	Rata
CD3	DakoCytomation	A0452	HI: 1/100	Conejo
pCNA	Santa Cruz	sc-56	HI: 1/100	Conejo
α -tubulina	Zymed	32-2500	WB: 1/1000	Ratón
Caspasa 3	Cell Signaling	9662	WB: 1/1000	Conejo
NF- κ B (p65)	Santa Cruz	sc-372	WB: 1/2000	Conejo
Histonas	Chemicon	MAB052	WB: 1/4000	Ratón
Cleaved PARP	Cell Signaling	9544	WB: 1/1000	Conejo

Tabla M-1. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante “western-blot” (WB) e histoinmunofluorescencia (HI).

8. Análisis de proteínas por electroforesis e inmunodetección (*Western blot*).

8.1. Electroforesis.

Este método nos permite separar las proteínas en función de su peso molecular, variando el porcentaje de bis-acrilamida y la carga eléctrica de la misma, aplicando un campo eléctrico.

Las muestras procedentes de extractos totales, de extractos obtenidos por fraccionamiento citosólico y nuclear y de muestras inmunoprecipitadas, se prepararon en condiciones desnaturalizantes. Se les añadió tampón de carga 5x, que contiene un

5% β -mercaptoetanol (v/v) (apartado 1.1. de Materiales y métodos), y se calentaron a 90°C durante 5 min.

Las proteínas se separaron por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida a diferentes porcentajes en función del peso molecular de las proteínas que queríamos separar (entre 7% y 15%). Todo el aparataje usado y la fuente *Power pac 200* fueron de BIO-RAD.

8.2. Transferencia e inmunodetección (*Western blot*).

Las proteínas resueltas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Whatman*[®]) por un método de transferencia en húmedo, utilizando el tampón descrito en el apartado 1.1. de Materiales y métodos. La transferencia se llevó a cabo durante 2 horas, a un amperaje constante de 200mA, utilizando una fuente *Power pac 200*. La fuente, al igual que el resto del aparataje usado en la transferencia, fue de BIO-RAD. Para comprobar que la transferencia tuvo lugar correctamente, se tiñeron las membranas con “rojo ponceau” y se destiñeron posteriormente con TBS-T (apartado 1.1. de Materiales y métodos).

A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo que contiene un 5% de leche desnatada en polvo (w/v) disuelta en TBS-T durante 30 min, a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en solución de bloqueo a las concentraciones que se indican en la Tabla M-1, durante toda la noche a 4°C y en agitación o 2 horas a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación, las membranas se lavaron con TBS-T tres veces durante 10 min. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario específico, conjugado con HRP, diluido a 1/2000 (v/v) en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó con tres lavados con TBS-T de 10 min cada uno. Tras lo cual, se detectaron las proteínas utilizando el reactivo ECL (*Millipore*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se revelaron las películas quimiosensibles (*Konica-Minolta*) en una máquina de revelado SRX-101 (*Konica-Minolta*).

La procedencia de cada uno de los anticuerpos secundarios fue: anti-rata de *Molecular Probes*, anti-conejo de *Thermo scientific*, anti-oveja de *Thermo scientific* y anti-ratón de *Thermo scientific*.

9. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

9.1. Síntesis de cDNA.

Este proceso, permite amplificar una cantidad pequeña de moléculas de RNA diana en forma de cDNA mediante transcripción reversa del RNA a cDNA, y a continuación, este cDNA ser amplificado.

En la síntesis del cDNA se utilizó el kit “*High capacity cDNA reverse transcription*” (*Applied Biosystems*) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para transcribir 1 μ g de RNA total. Se utilizó una máquina de PCR Primus 96 (*MWG-Biotech AG*) siguiendo las siguientes condiciones para la síntesis del cDNA: 10 min a 25°C, seguido de 2 horas a 37°C. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C.

9.2. PCR cuantitativa.

La cantidad de cDNA se cuantificó con el Nanodrop y se hicieron diluciones 1/25 y 1/250 de 1 μ g de cDNA.

En el caso en el que se usó una sonda SYBR® Green, se pusieron 3µl por pocillo de la dilución de cDNA correspondiente y 5µl de “master mix”, que contiene 4µl de *Fluocycle SYBR® Green mix for Real-Time PCR* (EuroClone-Genyccell), 0.12µl de la mezcla de los oligonucleótidos específicos (“primer mix”) y 0.88µl de agua, dando un volumen final de 8µl. Se hizo un triplicado por cada muestra y se pusieron dos pocillos con agua como control negativo.

En el caso en el que se usó una sonda TaqMan®, se pusieron 3µl por pocillo de la dilución de cDNA correspondiente y 5µl de “master mix” que contiene 4µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 0.4µl “primer mix” de TaqMan® y 0.6µl de agua, dando un volumen final de 8µl. Se hizo un triplicado por cada muestra y se pusieron dos pocillos con agua como control negativo.

En ambos casos, las qRT-PCRs se realizaron con un aparato ABI PRISM 7900HT (*Applied Biosystem*). Todas las cuantificaciones por qRT-PCR fueron realizadas por el servicio de genómica del Departamento de Inmunología y Oncología (DIO) del CNB.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TNF α	TTGAGATCCATGCCGTTG	CTGTAGCCCACGTCGTAGC
IL1 β	TGGTGTGTGACGTTCCCAT	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
IL6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	CAGCACGAGGCTTTTTTGTG
IL10	TAAGGGTTACTTGGGTTGCCA	AGGCGCTGTCATCGATTCTC
MMP9	GAGCTGTGCGTCTTCCCCTTC	GGAATGATCTAAGCCCAGTGC
p38 α	AACCAGACAGTGGATATTTGGTC	TGAGCTTCAACTGATCAATATGGT
p38 β	GGCAGAGCCCTATGATGAAA	GGGGCTTGAAGCTAAGGACT
p38 γ	ATGCGCTACACGCAGACA	TGGTCATTGCCTTTGAACAG
p38 δ	TCGGAGCTTCCATGATTCT	CTGAATTCCATCCCCATGAT
β -catenina	GCAGCAGCAGTTTGTGGAG	TGTGGAGAGCTCCAGTACACC

Tabla M-2. Oligonucleótidos utilizados para valorar los niveles de mRNA mediante qRT-PCR.

Los oligonucleótidos específicos para cada gen a analizar fueron diseñados mediante el software *Universal Probe Library* (www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl, Roche) y aparecen en la tabla M-2. Para determinar los niveles de mRNA de la proteína COX2 mediante qRT-PCR se utilizó el kit *Taqman gene expression assays* (*Applied Biosystems*, MM00478374_M1).

El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software ABI PRISM SDS v2.2.2.

Se calculó la expresión relativa de cada muestra usando el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Este método considera que para un gen determinado, la cantidad de amplicón es igual a $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerándose el C_t (“cycle threshold”) como el ciclo en el que comienza a detectarse la fluorescencia emitida por el producto de PCR.

El valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ indica la expresión relativa de un gen determinado en número de veces respecto a una condición control. En nuestros ensayos, se consideró condición control a la expresión del gen en los ratones wt sin ningún tipo de tratamiento previo.

Las muestras se normalizaron primero frente a un control interno, el 18S, estableciendo la relación entre la expresión del mRNA de cada muestra y el rRNA (RNA ribosomal) como ΔC_t ($\Delta C_t = C_{t_{\text{muestra}}} - C_{t_{18S}}$) y a continuación se relativizaron los datos a la condición control, y se calculó el $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{muestra}}} - \Delta C_{t_{\text{ratón wt}}}$).

10. Medida de los niveles de citoquinas por Luminex®

10.1. Cultivo de tejidos de colon.

Después del tratamiento correspondiente (apartado 4.1. de Materiales y métodos), los animales se sacrificaron y se les extrajo el colon. Éste se abrió longitudinalmente y se limpiaron los restos de heces. A continuación, se troceó el colon con unas tijeras en pequeños trozos, de unos milímetros, y se colocó cada colon en un pocillo de una placa multipocillo de 24, con 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 200 U/ml de penicilina y 0.2 mg/ml de estreptomycin. Estos tejidos se mantuvieron en cultivo durante 24h en un incubador con una humedad relativa del 95%, un 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C. Tras este tiempo, los cultivos se recogieron y se centrifugaron con una centrífuga de mesa refrigerada (4°C) (Mikron 200R de *Hettich zentrifugen*), a 15000 r.p.m. durante 15 min. Los sobrenadantes se recogieron, desechando el “*pellet*”, y sobre estos sobrenadantes se midieron los niveles de diferentes citoquinas mediante Luminex®.

10.2. Luminex®.

El método de Luminex® se basa en la utilización de unas microesferas que contienen sondas fluorescentes, y a su vez están recubiertas por un anticuerpo específico frente a la molécula de interés.

En el ensayo se ponen en contacto las microesferas con la solución que contiene la molécula diana. A continuación, se añade un anticuerpo biotinilado, específico frente a nuestra molécula problema. Este segundo anticuerpo reconoce un epítipo diferente al anticuerpo que recubre las microesferas. Posteriormente, se añade a la mezcla estreptavidina-PE, para que se complete la reacción en la superficie de la microesfera. Al pasar las microesferas por un láser que excite las sondas fluorescentes de las microesferas, obtenemos una medida del número de microesferas que tenemos. Al pasar un segundo láser que excite el PE de la molécula “reportera”, obtenemos una medida de la cantidad de molécula problema que se ha unido a las microesferas. Así obtenemos una medida directa de la cantidad de molécula problema que tenemos en nuestra solución.

Para llevar acabo este método en nuestros sobrenadantes se utilizó el kit Milliplex® MAP (Millipore, MPXMCYTO-70K) y se siguieron las instrucciones de uso del fabricante. Se usó una aparato Luminex¹⁰⁰ IS™ xMAX v2.2 (*Millipore*). El análisis de citoquinas mediante Luminex® fue realizado por el servicio de citometría del CNB.

11. Detección de células apoptóticas por la técnica de TUNEL.

Esta técnica se basa en la detección de la rotura del DNA internucleosomal, típico de los procesos apoptóticos. Al fragmentarse el DNA, se exponen sus extremos 3'-OH, lo que hace que se puedan incorporar nucleótidos marcados (deoxiuridina (dUTP) biotinilada) a dichos extremos mediante la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT).

Esta técnica se llevó a cabo en secciones de tejido de colon en parafina de 5µm de grosor. Las secciones se desparafinaron mediante baños sucesivos en xilol (3x5 min), etanol absoluto (2x5 min), etanol 95% (v/v) (2x5 min), etanol 70% (v/v) (2x2 min), etanol 50% (v/v) (2x2 min), agua MilliQ (2 min), agua del grifo (5 min) y PBS (2x5 min).

A continuación, el tejido se permeabilizó mediante un tratamiento con un 0.5% de Triton-X-100 (v/v) diluido en PBS, durante 10 min a temperatura ambiente. Tras lo cual, las muestras se lavaron con PBS y se pre-incubaron con un tampón TdT1x (apartado 1.1. de Materiales y métodos) en PBS, complementado con 1mM de CoCl₂, durante 15 min a

temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura. Posteriormente, las secciones se incubaron con la mezcla de reacción TdT (apartado 1.1. de Materiales y Métodos) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y oscura. A lo largo de este tiempo la enzima TdT cataliza la reacción de unión de los nucleótidos marcados (dUTP biotinilados) a los extremos 3'-OH del DNA fragmentado. Seguidamente, las secciones se incubaron con tampón TdT1x en PBS complementado con 1mM de CoCl_2 durante 10 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura.

La reacción se detuvo mediante 2 lavados de 10 min en PBS con un 0.01% de Tween20 (v/v), seguido de un lavado en PBS.

Para amplificar la señal de la biotina unida a los nucleótidos y disponer de un sistema de detección, las secciones se incubaron con estreptavidina unida a una sonda fluorescente (Cy5) diluida en PBS (1/500, v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura. La sonda Cy5 tiene la capacidad de absorber luz a una longitud de onda de entre 625-650nm y emitirla a 670nm, lo que nos permite detectarla con un microscopio confocal.

Las secciones se lavaron con PBS y se tiñeron los núcleos celulares con el tinte vital Hoechst 33342 disuelto en PBS (10mg/ml) durante 10 min, en cámara húmeda y oscura. Se lavó el excedente de tinte con PBS y se procedió al montaje de las preparaciones con medio de montaje (apartado 1.2. de Materiales y métodos) y colocación de los cubres.

La valoración de la apoptosis se llevó acabo mediante microscopía confocal para la toma de imágenes (TCS SP5, Leica) y posterior conteo de células positivas. La adquisición de fotografías de fluorescencia fue llevada a cabo por el servicio de microscopia confocal del CNB.

12. Análisis estadísticos.

Los estudios estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS v.20. Usándose el test t de *Student* para comparar medias y los test Chi cuadrado y *Mann-Whitney* para comparar distribuciones de variables nominales. Los resultados se muestran como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.).

RESULTADOS

1. Cáncer de colon asociado a colitis ulcerosa.

La inducción del CAC se llevó a cabo tratando grupos de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} con AOM/DSS, como se describe en el apartado 3.2. de Materiales y métodos. Durante y tras el tratamiento, a los 62 días de la inyección con AOM, se midieron una serie de parámetros que se ven alterados en función del grado de afectación de los animales. Dichos parámetros son: la supervivencia, la pérdida de peso y el acortamiento en la longitud del colon (Fig. R-1). También se realizaron secciones histológicas del colon de los ratones tratados o no con AOM/DSS. Se hicieron tinciones con H&E a intervalos regulares de 200 μ m a lo largo de todo el colon, tal y como se explica en el apartado de Materiales y métodos 4.2.1. A continuación, se realizó un estudio histopatológico de los tejidos, valorando la presencia de tumores (Fig. R-2) y/o lesiones en la mucosa colónica, como son las úlceras (Fig. R-3).

1.1. Efectos del tratamiento con AOM/DSS.

1.1.1. Supervivencia, variación de peso y de la longitud del colon.

La supervivencia se evaluó a lo largo del tratamiento y se observó que a tiempo final, había una reducción del 3% en los animales wt, un 30% en los p38 γ ^{-/-} y un 10% en los p38 δ ^{-/-}. Siendo estadísticamente significativas las diferencias observadas entre los ratones wt y los p38 γ ^{-/-}. En el caso de los ratones p38 γ/δ ^{-/-}, no se encontró ninguna reducción en el grado de supervivencia (Fig. R-1.A).

En el caso de la variación de peso, todos los animales control aumentaron entre un 10% y un 20% su peso durante el tiempo que duró el tratamiento. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, tras finalizar el tratamiento con AOM/DSS, los ratones wt y p38 δ ^{-/-} aumentaron de peso un 6% y un 5% respectivamente. Mientras que los ratones p38 γ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} sufrieron una reducción significativa respecto a los animales wt. La bajada de peso de los ratones p38 γ ^{-/-} (6%) fue mucho más acusada que la de los ratones p38 γ/δ ^{-/-} (0,25%), aunque en ambos casos esta baja fue estadísticamente significativa (Fig. R-1.B).

Por otro lado, el tratamiento con AOM/DSS causó una reducción en la longitud del colon en todos los genotipos, en relación con sus respectivos controles. Este acortamiento es similar en los ratones wt, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, entorno al 6%. Por el contrario, destaca la acusada reducción en la longitud del colon de los animales p38 γ ^{-/-}, un 19%, una diferencia estadísticamente significativa al compararlos con los wt (Fig. R-1.C).

Por tanto, a nivel sintomatológico, los resultados indican que los ratones p38 γ ^{-/-} son más sensibles al tratamiento con AOM/DSS que el resto de los genotipos, ya que presentan una menor supervivencia, una mayor bajada de peso y un mayor acortamiento en la longitud del colon tras el tratamiento.

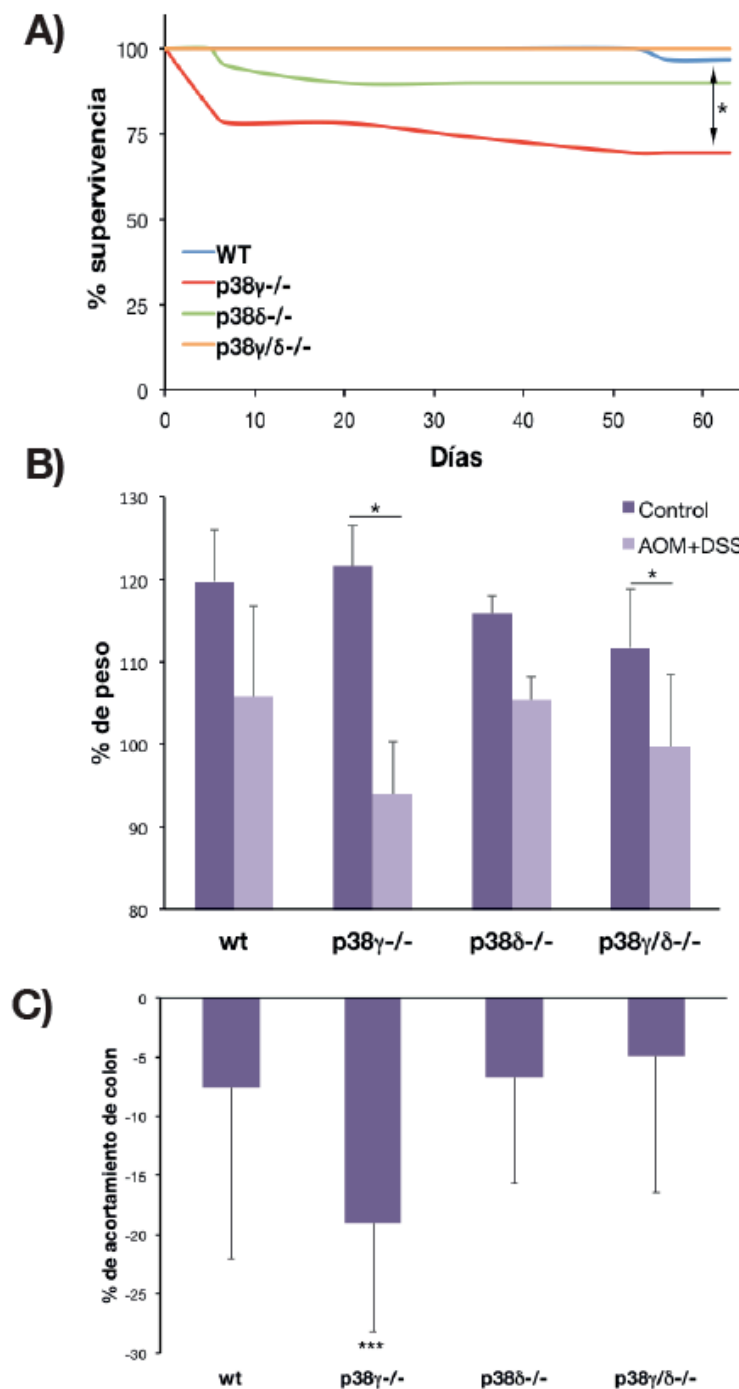
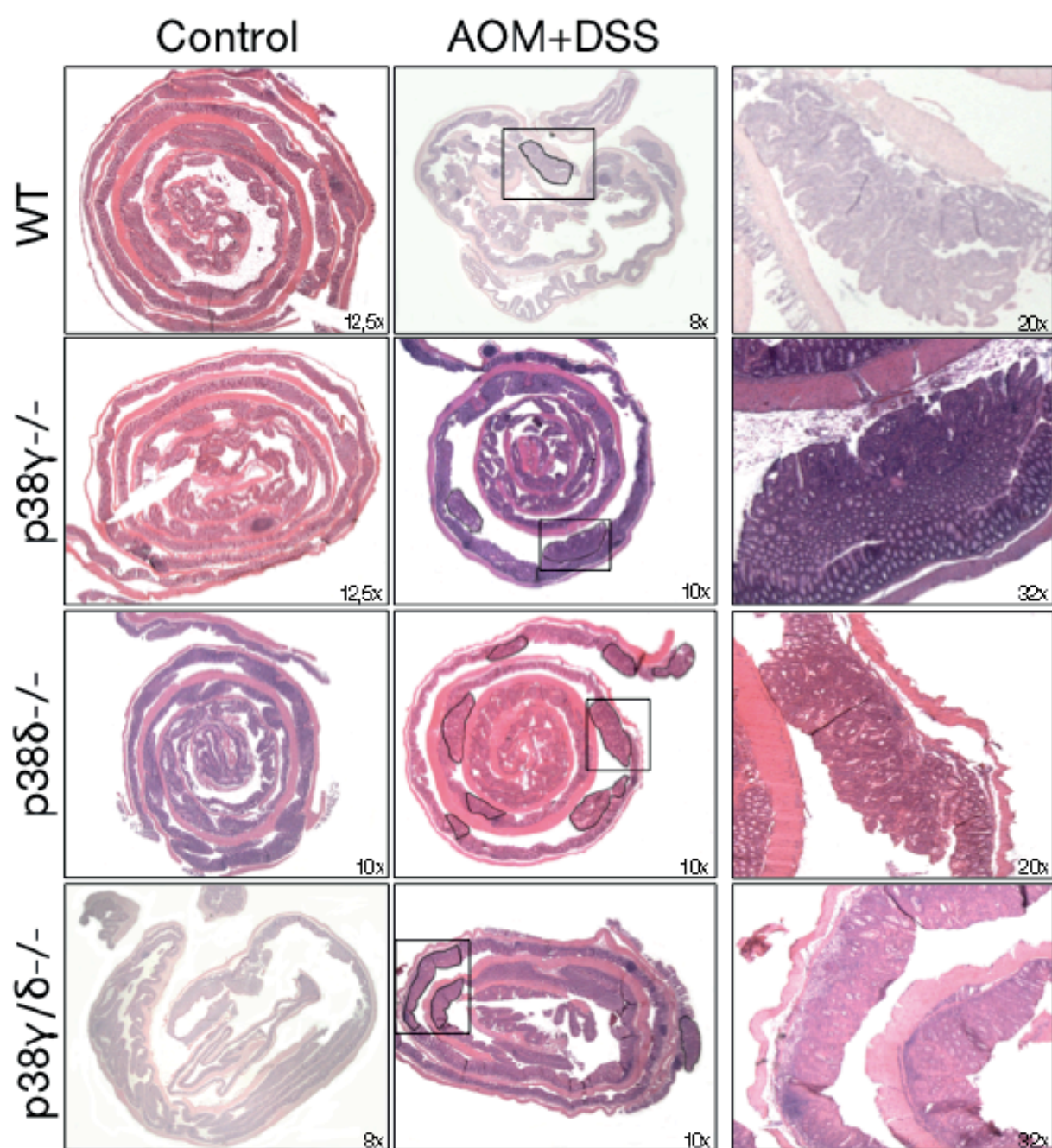


Fig. R-1. Efectos del tratamiento con AOM/DSS sobre la supervivencia, la variación de peso y la longitud del colon en ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}. **A)** Porcentajes de supervivencia de los ratones wt (n=31), p38 γ ^{-/-} (n=23), p38 δ ^{-/-} (n=20) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=25) a lo largo del tratamiento con AOM/DSS. *p<0,05. **B)** Porcentajes de peso en los animales tratados o no con AOM/DSS con respecto a su peso inicial, antes del tratamiento, en ratones wt (n=36), p38 γ ^{-/-} (n=16), p38 δ ^{-/-} (n=18) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=33). *p<0,05. **C)** Porcentaje de acortamiento en la longitud del colon en los animales tratados con AOM/DSS respecto a los no tratados, wt (n=40), p38 γ ^{-/-} (n=17), p38 δ ^{-/-} (n=18) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=34). ***p<0,001. Los resultados presentados en esta figura son de 2 experimentos distintos.

1.1.2. Aparición de tumores.

A)



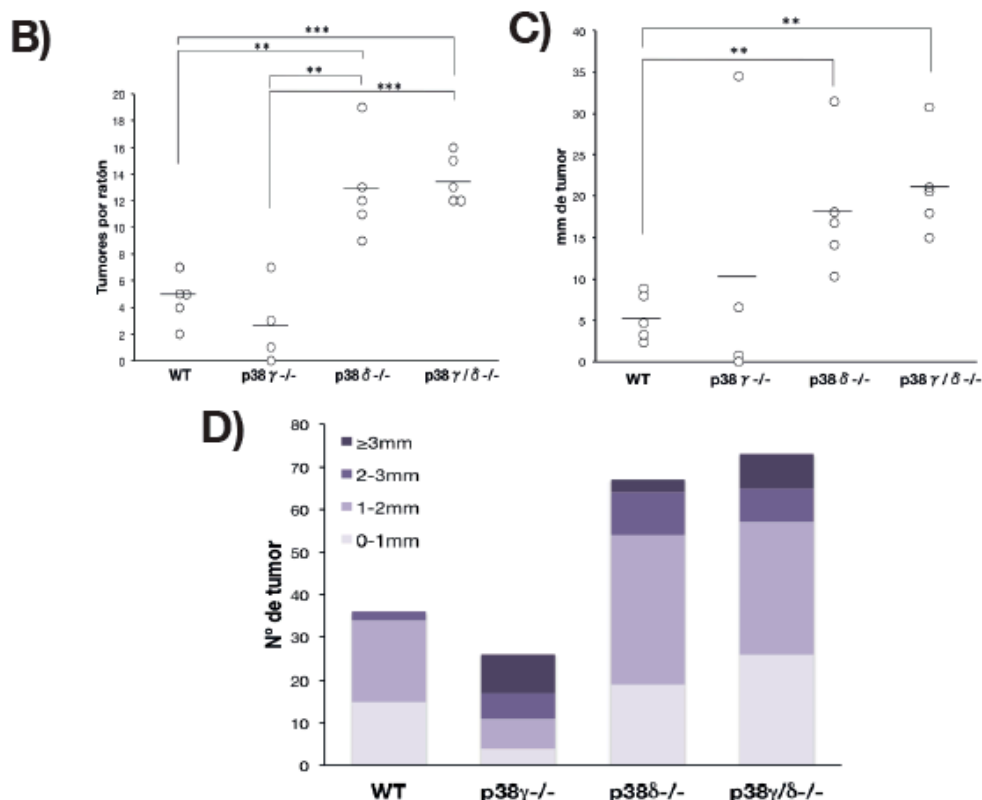


Fig. R-2. Los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} presentan mayor número de tumores que los ratones wt y p38 γ ^{-/-} tras el tratamiento con AOM/DSS. A) Secciones representativas teñidas con H&E del colon de ratones sin tratar (control) y ratones tratados (AOM+DSS) donde se muestran delimitadas las zonas de tumor (----). Una magnificación de los tumores en el recuadro se muestran en la tercera columna. En las distintas secciones la parte externa de la espiral es la zona distal del colon, mientras que en la parte interna, corresponde a la zona proximal del mismo. **B)** Representación gráfica del número de tumores contabilizados por ratón en animales wt (n=5), p38 γ ^{-/-} (n=4), p38 δ ^{-/-} (n=5) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=5). **p<0,01; ***p<0,001. **C)** Representación gráfica de la extensión total de las zonas tumorales medidas en superficie de los ratones wt (n=5), p38 γ ^{-/-} (n=4), p38 δ ^{-/-} (n=5) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=5). **p<0,01. **D)** Distribución de los diferentes tumores analizados en función de su extensión medida en superficie wt (n=5), p38 γ ^{-/-} (n=4), p38 δ ^{-/-} (n=5) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=5).

En el análisis histopatológico de las secciones teñidas con H&E se observó, que de modo espontáneo ninguno de los ratones control, independientemente del genotipo, desarrolló tumores a lo largo del ensayo (Fig. R-2.A). En el colon de los animales tratados con AOM/DSS se observó la presencia de masas tumorales en todos los genotipos (Fig. R-2.A). La aparición de estos tumores se acota a la zona media-distal del colon, no habiéndose detectado ningún tumor en la zona proximal del mismo. En la figura R-2.A (tercera columna) podemos observar con mayor detalle, que en todos los genotipos, los tumores encontrados son adenocarcinomas tipo pólipo.

Además, se cuantificó el número total de tumores encontrados en las secciones realizadas para cada colon (Fig. R-2.B) y se midió el tamaño de dichos tumores en superficie (Fig. R-2.C y R-2.D).

Comparando el número de tumores contabilizados por ratón (Fig. R-2.B), observamos que los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tienen mayor número de tumores que los wt y los p38 γ ^{-/-}. En los animales p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} encontramos 12,8 y 13,6 tumores por ratón respectivamente, mientras que en los wt y p38 γ ^{-/-} vemos 5 y 2,75 tumores por ratón respectivamente. Al hacer el análisis estadístico observamos

que las diferencias entre wt y p38 $\delta^{-/-}$ o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ son significativas, así como las diferencias entre p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\delta^{-/-}$ o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$.

Al analizar la extensión total tumorada del colon de cada ratón (Fig. R-2.C), vemos que los animales p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan mayor extensión que los wt y los p38 $\gamma^{-/-}$, con una extensión de 18,1 y 21,1 mm respectivamente, frente a los 5,4 y 10,4 mm de wt y p38 $\gamma^{-/-}$ respectivamente. Los estudios estadísticos nos permitieron determinar que las diferencias entre wt y p38 $\delta^{-/-}$ o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ son significativas.

También estudiamos el número de tumores en función de su extensión (Fig. R-2.D). Observamos que los ratones wt presentaban 15 tumores de entre 0 y 1 mm, 19 tumores de entre 1 y 2 mm, y sólo 2 tumores por encima de los 2 mm. Sin encontrarse tumores por encima de los 3 mm. Por el contrario, los animales deficientes en p38 γ , presentaban la mayoría de los tumores con una extensión superior a los 3 mm. En el caso de los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ observamos una distribución muy semejante, donde la mayoría de los tumores encontrados oscilaban entre 2 y 3 mm (35 y 31 tumores respectivamente).

Estos resultados histopatológicos muestran que los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un comportamiento parecido, con un número y tamaño de los tumores muy semejantes, aunque ligeramente de mayor tamaño en los p38 $\gamma/\delta^{-/-}$.

1.1.3. Aparición de úlceras.

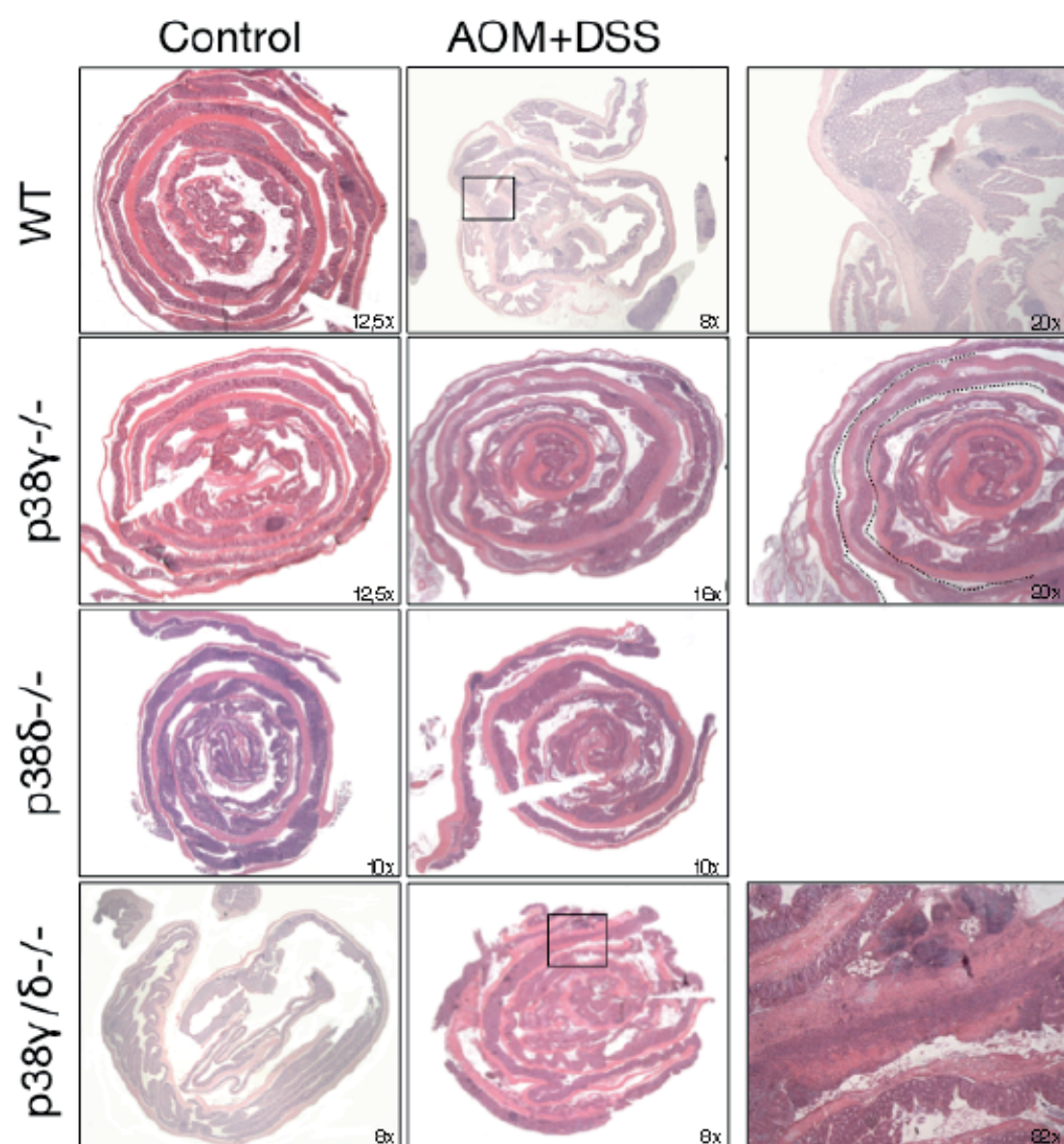
También observamos que, al igual que con los tumores, los animales control de todos los genotipos no desarrollaron úlceras de modo espontáneo (Fig. R-3.A). Por el contrario, tras el tratamiento con AOM/DSS se observó la presencia de úlceras en todos los genotipos, menos en los animales p38 $\delta^{-/-}$ (Fig. R-3.A). En la figura R-3.A (tercera columna) se muestra con mayor detalle que, las úlceras que aparecen en los ratones tratados, se delimitan a la mucosa. Además, presentan una pérdida en la continuidad del epitelio y en la estructura de la mucosa, ambas características de la colitis ulcerosa.

En la valoración histológica, se contabilizó el número de úlceras totales por animal (Fig. R-3.B), se determinó la extensión total ulcerada en cada ratón (Fig. R-3.C) y se cuantificó el número de úlceras en función de su extensión (Fig. R-3.D). Los animales wt, p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentaron el mismo número de úlceras tras el tratamiento con AOM/DSS, entorno a 4. Mientras que los ratones p38 $\delta^{-/-}$ no presentaron ninguna úlcera tras el tratamiento. Al hacer el análisis estadístico, observamos que sólo son significativas las diferencias entre p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, esto puede deberse a la gran dispersión que presentan los datos obtenidos con los animales wt y p38 $\gamma^{-/-}$ (Fig. R-3.B).

Al comparar la extensión ulcerada del colon tras el tratamiento en cada genotipo (Fig. R-3.C), vimos que los animales wt eran los que menor extensión presentaban (1,4 mm), frente a los p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (6,9 mm y 5,8 mm respectivamente). Tras el análisis estadístico, observamos diferencias significativas entre los animales p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. La falta de diferencias estadísticamente significativas entre p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma^{-/-}$ puede deberse a la dispersión de datos que obtuvimos en los animales p38 $\gamma^{-/-}$.

Todas las úlceras encontradas en los animales wt tenían un tamaño de entre 0 y 1 mm, mientras que las de los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ presentaban una mayor variabilidad. Encontramos 9 úlceras de entre 0-1 mm, 5 úlceras de entre 1-2 mm y 6 úlceras de más de 2 mm. En el caso de los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, observamos que la mayoría de las lesiones encontradas tenían un tamaño de entre 0 y 1 mm (18), aunque también se encontraron úlceras por encima de los 2 mm (5). Los estudios estadísticos mostraron que las diferencias entre p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ eran significativas (Fig. R-3.D).

A)



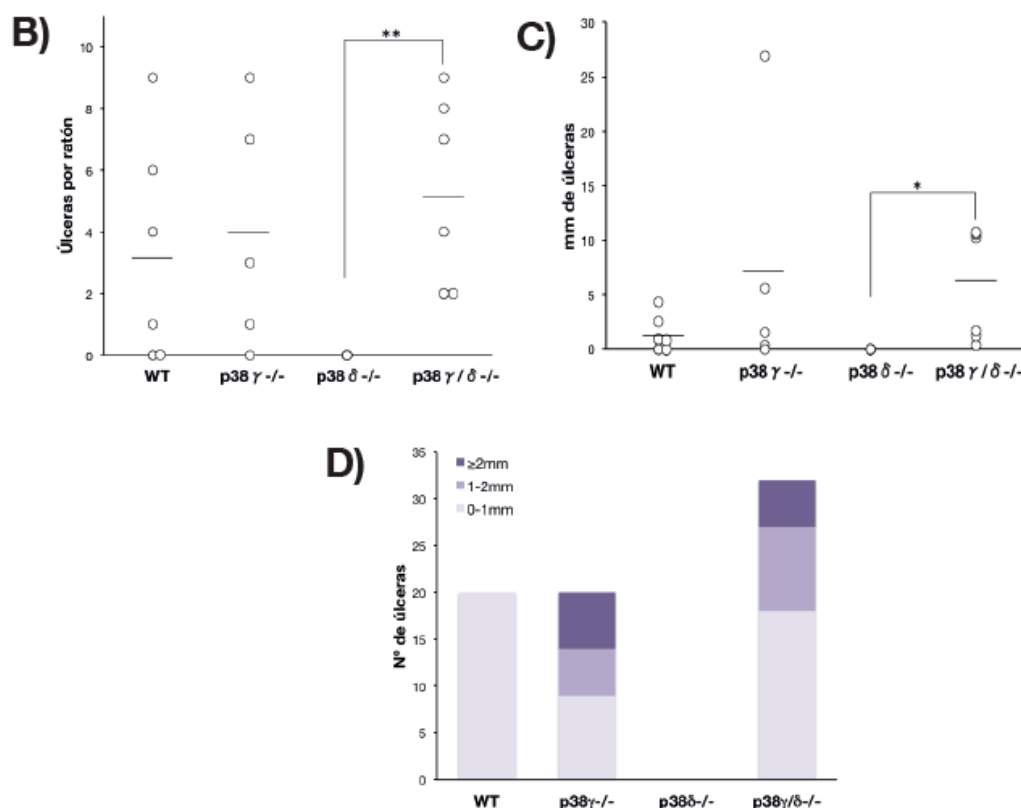


Fig. R-3. Los ratones carentes en p38 δ ^{-/-} no desarrollan úlceras tras el tratamiento con AOM/DSS.

A) Secciones representativas teñidas con H&E de ratones sin tratar (control) y ratones tratados (AOM+DSS). En la tercera columna se muestran con mayor detalle las zonas ulceradas (----). Las distintas secciones muestran en la parte externa de la espiral la zona distal del colon y en la parte interna la zona proximal del colon. **B)** Representación gráfica del número de úlceras contabilizadas por ratón en ratones wt (n=5), p38 γ ^{-/-} (n=5), p38 δ ^{-/-} (n=6) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=5). **p<0,01. **C)** Representación gráfica de la extensión total de las zonas ulceradas medidas en superficie de los ratones wt (n=6), p38 γ ^{-/-} (n=5), p38 δ ^{-/-} (n=6) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=6). *p<0,05. **D)** Distribución de las úlceras analizadas en función de su extensión medida en superficie wt (n=6), p38 γ ^{-/-} (n=5), p38 δ ^{-/-} (n=6) y p38 γ/δ ^{-/-} (n=6). *p<0,05.

Estos resultados muestran que los animales carentes en p38 δ no presentan lesiones ulcerosas en la mucosa del colon tras el tratamiento con AOM/DSS, mientras que el resto de genotipos si. En el caso de los animales p38 γ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, el número de lesiones es semejante al encontrado en wt. Por el contrario, el tamaño total de colon ulcerado es mayor en los animales p38 γ ^{-/-} (6,9 mm) y p38 γ/δ ^{-/-} (5,8 mm) respecto a los wt (1,4 mm).

1.2. Procesos celulares que contribuyen a la aparición y desarrollo tumoral.

Las células epiteliales de la mucosa del colon están en un constante proceso de proliferación y muerte celular o apoptosis, para así mantener la homeostasis y regular la barrera intestinal. Alteraciones en estos procesos fisiológicos pueden conllevar la aparición de tumores. Por lo que decidimos analizar ambos procesos y si estaban afectando a la aparición de tumores y/o lesiones ulcerosas, en el colon de ratones tratados o no con AOM/DSS.

1.2.1. Proliferación celular.

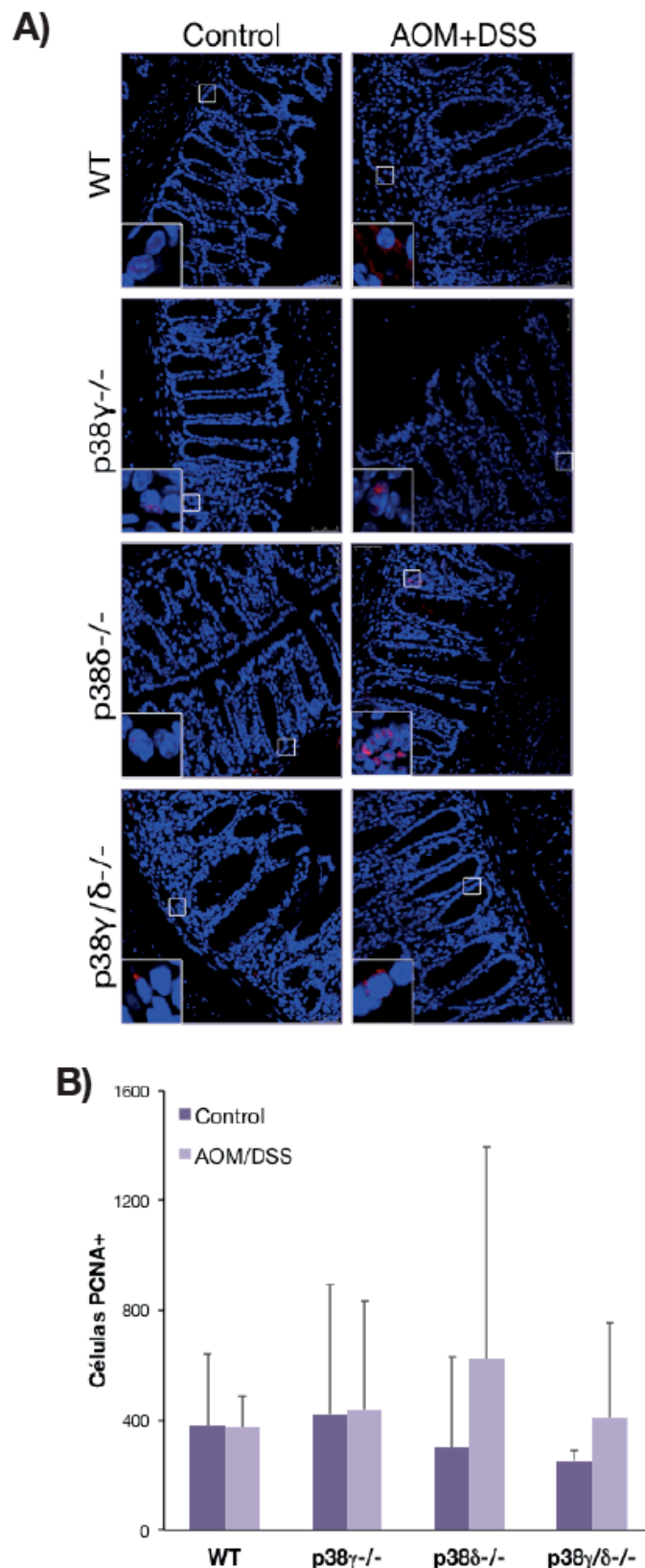


Fig. R-4. Proliferación de células de la mucosa intestinal tras el tratamiento con AOM/DSS. A) Secciones de colon de animales (wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$) tratados o no con AOM/DSS teñidas con anti-pCNA (rojo) o con Hoechst para visualizar los núcleos (azul). La señal se detectó por inmunofluorescencia y en la figura se muestran campos representativos de diferentes secciones. **B)** Representación gráfica de la cuantificación de

las células positivas para pCNA en el colon de los ratones wt ($n_{\text{total}}=6$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$), tratados (AOM/DSS) o no tratados (control). De cada ratón se cuantificaron 30 campos.

Para determinar la capacidad proliferativa de la mucosa intestinal de animales wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, tratados o no con AOM/DSS, se examinó la presencia de la proteína pCNA (por inmunofluorescencia) en secciones histológicas de colon (Fig. R-4.A). La proteína pCNA se sintetiza en fases tempranas del ciclo celular, entre la fase G_1 y S, participando en la progresión del ciclo celular, en la replicación del DNA y en la reparación del mismo. Por lo tanto, su presencia en las células indica que éstas están proliferando. La cuantificación se llevó a cabo contando las células positivas para pCNA ($pCNA^+$) en 30 campos seleccionados aleatoriamente, en cada ratón (Fig. R-4.B).

Las tinciones mostraron que, en la mayoría de los casos, las células $pCNA^+$ se localizaban en el fondo de las criptas, donde habitualmente se da la proliferación de las células progenitoras (Fig. R-4.A). Los controles de los cuatro genotipos presentaron unos niveles de proliferación similares, aunque los de los ratones $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ fueron ligeramente inferiores (Fig. R-4.B). Tras el tratamiento, los ratones wt y $p38\gamma^{-/-}$ presentaron un número de células $pCNA^+$ muy semejante al observado en condiciones control. Por el contrario, los animales $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ sufrieron un aumento de la proliferación celular tras el tratamiento. Éste fue mucho más acusado en el caso de los $p38\delta^{-/-}$ (el doble que su control) (Fig. R-4.B).

Nuestros resultados indican que los animales carentes en $p38\delta$, así como los $p38\gamma/\delta^{-/-}$, ven aumentada su proliferación tras el tratamiento con AOM/DSS, lo que podría contribuir a la aparición de tumores.

1.2.2. Apoptosis.

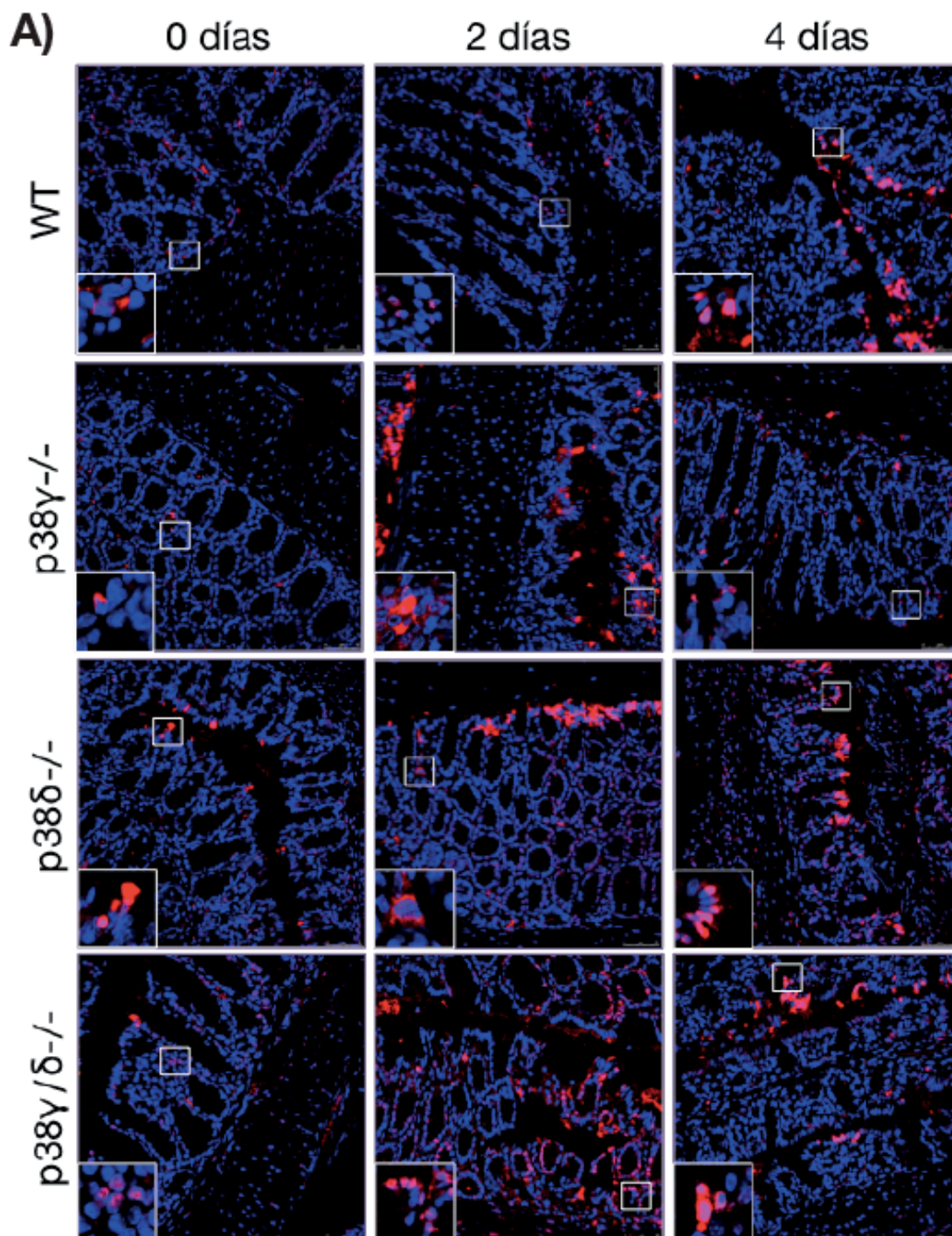
El análisis del proceso de apoptosis se abordó en fases tempranas de la colitis ulcerosa, a los 0, 2 y 4 días de la administración de DSS (3%) (apartado 3.1. de Materiales y métodos) en ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$. Por un lado, se estudió la apoptosis mediante la técnica de TUNEL (apartado 11. de Materiales y métodos) en secciones histológicas (Fig. R-5.A) y se cuantificaron las células teñidas positivamente (Fig. R-5.B), y por otro lado, se estudiaron los niveles de expresión de la proteína caspasa 3 implicada en apoptosis (Fig. R-5.C). La caspasa 3, es una de las principales proteínas ejecutoras de apoptosis, implicada en la proteólisis de proteínas clave en el desarrollo de este proceso (Jin & El-Deiry, 2005). Por tanto la caspasa 3 es un claro marcador de células apoptóticas.

En las secciones histológicas, observamos que en la mayoría de los campos evaluados, la señal de apoptosis se localizaba en la zona media-distal de las criptas, independientemente de si los animales fueron tratados o no con DSS. Esto coincide con el proceso habitual de que las células que sufrían apoptosis eran las células epiteliales de las criptas, quisimos analizar en más detalle la expresión de marcadores de apoptosis en las mismas. Por lo que aislamos células epiteliales de ratones wt y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, donde las diferencias de apoptosis evaluadas en las secciones histológicas fueron mayores (Fig. R-5.C). Los niveles de caspasa 3 no varían tras el tratamiento con DSS en células wt, pero si disminuyen en las células $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-5.C). Los niveles basales de caspasa 3 son significativamente menores en células $p38\gamma/\delta^{-/-}$ que en células wt (Fig. R-5.C), coincidiendo con los resultados mostrados en la figura R-5.B.

La cuantificación de las células apoptóticas mostró que los animales wt, $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\delta^{-/-}$ presentaban un estado basal semejante. Mientras que los ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ presentaban unas 7 veces más células apoptóticas que el resto de los genotipos. Los animales deficientes en $p38\gamma$, $p38\delta$ o $p38\gamma/\delta$, sufrieron un aumento en el

proceso apoptótico tras el tratamiento mucho más acusado que los animales wt. Aunque sólo las diferencias entre wt y $p38\gamma^{-/-}$ a tiempos 2 y 4 días de tratamiento, y entre wt y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ a 4 días de tratamiento, fueron estadísticamente significativas (Fig. R-5.B).

Los resultados obtenidos con ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ muestran que ambas isoformas participan en la regulación del proceso de apoptosis, aunque sugieren una mayor implicación de la isoforma $p38\gamma$.



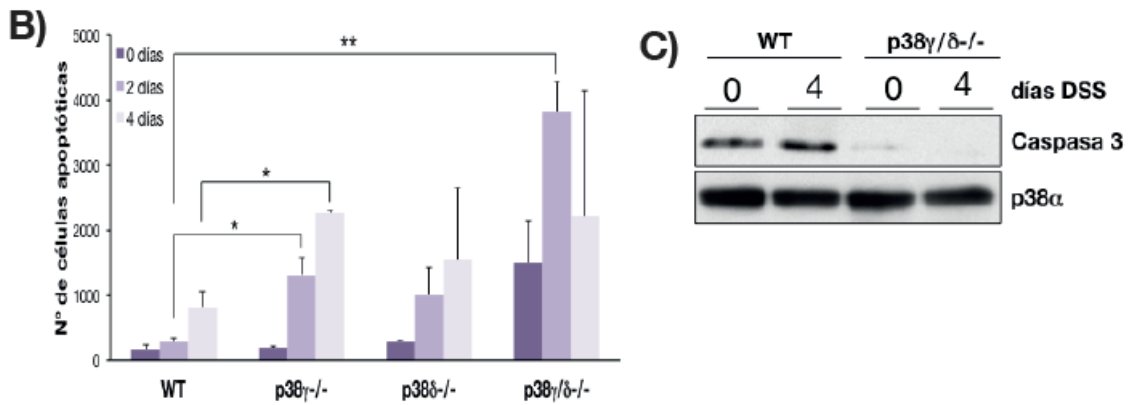


Fig. R-5. Los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un mayor grado de apoptosis que los ratones wt tras el tratamiento con DSS. **A)** Campos de secciones representativas de los ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ a los 0, 2 y 4 días de tratamiento con un 3% de DSS, donde se muestra el grado de apoptosis detectado por TUNEL. En rojo aparecen las células apoptóticas y en azul los núcleos celulares teñidos con Hoechst. **B)** Representación gráfica del número de células en las secciones histológicas valoradas por TUNEL de los ratones wt ($n_{\text{total}}=6$), p38 $\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$), p38 $\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$) y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$) a tiempo 0, 2 y 4 días de tratamiento con un 3% de DSS. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. De cada ratón se cuantificaron 30 campos. **C)** Western blot representativo de la proteína caspasa 3, en lisados de células epiteliales de colon de ratones wt y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ a tiempos 0 y 4 días de tratamiento con un 3% de DSS.

1.3. Estado de las MAPKs.

Se ha descrito la implicación de las diferentes familias de las MAPKs en distintos procesos que pueden contribuir a la aparición de tumores (Cuadrado & Nebreda *et al.*, 2010; Lawrence *et al.*, 2008; Junttila *et al.*, 2008). Por lo que analizamos la expresión y el estado de activación de estas proteínas, para así determinar su posible participación en la aparición de tumores en los diferentes genotipos estudiados.

1.3.1. Niveles de expresión y activación de p38MAPKs.

Estudiamos la expresión de las diferentes isoformas de la familia de p38MAPKs a nivel de mRNA y de proteína total, así como de proteína fosforilada (Fig. R-6), en animales wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tratados o no con AOM/DSS.

Tras el tratamiento con AOM/DSS los niveles de mRNA de p38 α aumentaron en todos los genotipos. Este incremento fue mucho menos acusado en los ratones p38 $\gamma^{-/-}$, y fue estadísticamente significativo en el caso de los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-6.A). Al mismo tiempo, tras el tratamiento, la expresión de p38 β sufrió un gran aumento en todos los genotipos, siendo éste más acusado en los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-6.B), donde estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los niveles de mRNA de p38 γ también aumentaron con el tratamiento de AOM/DSS en wt y p38 $\delta^{-/-}$, siendo el incremento en los ratones p38 $\delta^{-/-}$ más significativo que en los wt, lo que indicaría una posible compensación por falta de p38 γ (Fig. R-6.C). Como cabría esperar, no hubo expresión de mRNA de p38 γ en ratones deficientes en p38 γ o en ratones deficientes en p38 γ/δ (Fig. R-6.C). Por otro lado, el incremento del mRNA de p38 δ tras el tratamiento fue similar en los ratones wt y p38 $\gamma^{-/-}$. Los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ no expresaron mRNA de p38 δ (Fig. R-6.D).

Al estudiar los niveles de expresión de proteína de las diferentes isoformas de p38MAPKs, observamos que el tratamiento con AOM/DSS, en general, no afectaba a los niveles de expresión de las proteínas, contrariamente a lo obtenido con los niveles de mRNA (Fig. R-6.E). Todos los genotipos presentaron niveles similares de p38 α . En el caso de p38 β , su expresión varió en función del genotipo,

presentando mayores niveles de proteína los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ y mucho menores los animales $p38\delta^{-/-}$. Además, su expresión aumentó tras el tratamiento con AOM/DSS en ratones $p38\gamma^{-/-}$. Como era de esperar, $p38\gamma$ no se expresó en ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, mientras que sus niveles fueron similares en wt y $p38\delta^{-/-}$. Igualmente, $p38\delta$ no se expresó en animales $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, y sus niveles fueron iguales en wt y $p38\gamma^{-/-}$.

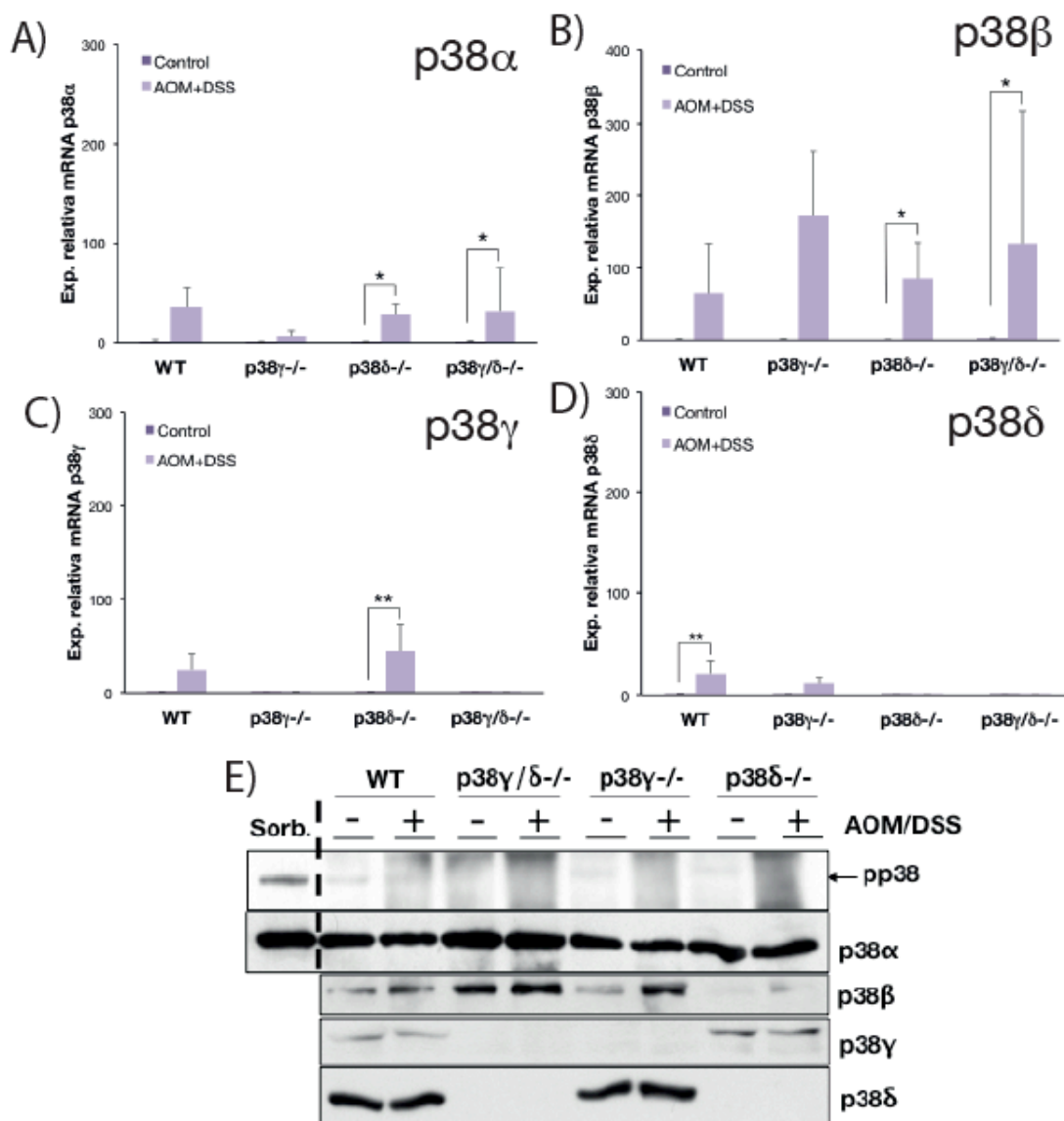


Fig. R-6. Niveles de expresión de mRNA de p38α, p38β, p38γ y p38δ, así como niveles de proteína y de activación de las p38MAPKs tras el tratamiento con AOM/DSS. A-D) Representaciones gráficas de la expresión de las distintas isoformas de las p38MAPKs analizadas en muestras de colon de ratones wt ($n_{total}=17$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{total}=8$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{total}=9$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{total}=16$) en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. **E)** WBs representativos de los niveles de las cuatro isoformas de p38MAPKs, así como su estado de fosforilación de extractos totales de colon de animales wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, en condiciones control (-) y tras el tratamiento con AOM/DSS (+). Se muestra un control positivo para la fosforilación de las p38MAPKs, en el que se utilizaron células HEK293 estimuladas con sorbitol (0,5M) durante 10 minutos (Sorb.).

También estudiamos la activación de las p38MAPKs en respuesta al tratamiento con AOM/DSS, para lo cual analizamos su estado de fosforilación en extractos totales de colon mediante WB, utilizando un anticuerpo fosfo-específico

frente al motivo TGY fosforilado, (Fig. R-6.E). No detectamos fosforilación de ninguna de las isoformas con o sin tratamiento, en ninguno de los genotipos.

1.3.2. Otras proteínas MAPKs: ERK1/2 y JNKs.

Analizamos los niveles de proteína y el estado de fosforilación de JNK1/2 y ERK1/2 en extractos totales de colon de ratones tratados o no con AOM/DSS mediante WB (Fig. R-7).

Observamos que los niveles de expresión de JNK1/2 no variaron ni con el tratamiento ni en función del genotipo de los ratones. Además, no detectamos fosforilación de estas quinasas en ninguna de las condiciones del ensayo (Fig. R-7.A).

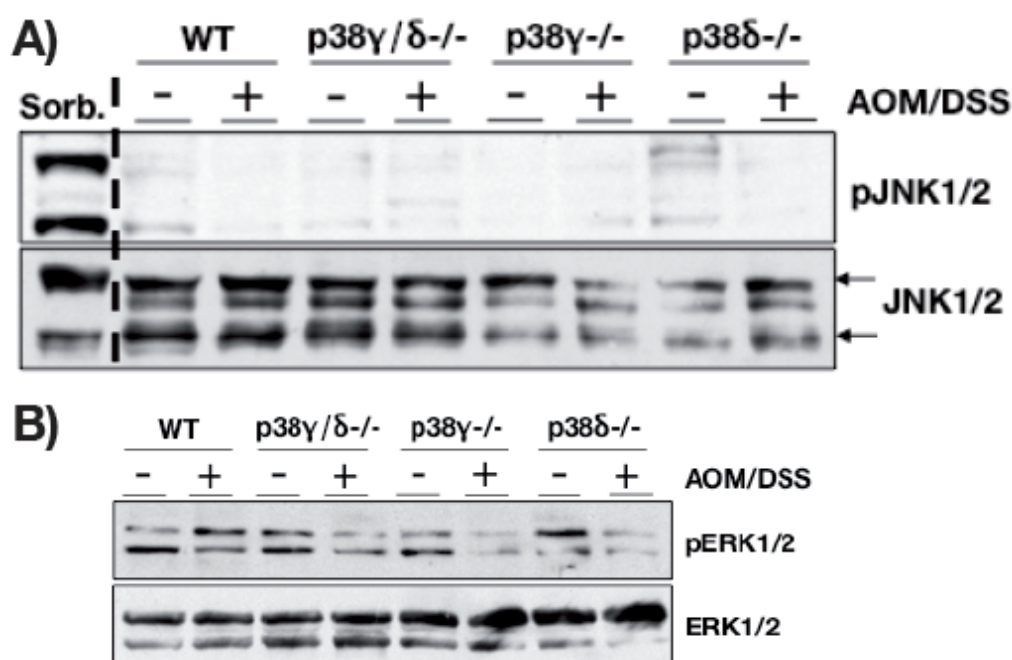


Fig. R-7. Niveles de expresión y de activación de JNK1/2 y ERK1/2 analizados en ratones tratados con AOM/DSS. **A)** WBs representativos de los niveles de expresión, así como, del estado de fosforilación de JNK1/2 medidas en extractos totales de colon de ratones wt, p38γ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38γ/δ^{-/-} tratados (+) o no (-) con AOM/DSS. Se muestra un control positivo de fosforilación de JNK1/2, en el que se utilizaron células HEK293 estimuladas con sorbitol (0,5M) durante 10 minutos (Sorb.) **B)** WBs representativos de los niveles de expresión, así como, del estado de fosforilación de ERK1/2 medidos en las mismas condiciones que en el panel A.

Al igual que para las JNKs, los niveles de ERK1/2 fueron similares en todas las condiciones estudiadas. Al analizar el estado de fosforilación, encontramos que ERK1/2 estaba fosforilada en condiciones basales en todos los genotipos, y hubo una ligera bajada tras el tratamiento con AOM/DSS (Fig. R-7.B).

1.4. Expresión de moléculas y células implicadas en CAC.

En el desarrollo del CAC hay un gran número de moléculas implicadas e interconectadas entre sí de un modo altamente complejo. Estas moléculas son esenciales en la aparición y desarrollo de los tumores (Porta *et al.*, 2009). Algunas de ellas son: la β-catenina (Polakis, 2007), COX2 (Wang & Dubois, 2010) o la metaloproteína MMP9 (Garg *et al.*, 2010), así como un amplio número de citoquinas pro- o anti-inflamatorias (Grivennikov *et al.*, 2010). En el desarrollo tumoral asociado a inflamación, también van a desempeñar un papel muy importante diversos

tipos celulares del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos o linfocitos (Mantovani *et al.*, 2008; Coussens & Werb, 2002). Por todas estas razones, decidimos analizar el estado de estas proteínas y tipos celulares en nuestros ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados o no con AOM/DSS, y así poder establecer una posible relación con la aparición o no de tumores y/o úlceras descritos anteriormente.

1.4.1. Proteínas relacionadas con CAC.

β -catenina.

Hemos examinado los niveles de expresión de β -catenina tanto a nivel de mRNA como de proteína, mediante WB (Fig. R-8). Al analizar los niveles de mRNA en los diferentes genotipos, observamos que con el tratamiento hubo una subida en la expresión de β -catenina en todos ellos. Aunque esta subida, en el caso de los ratones wt, fue significativamente mayor que en los ratones p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} (Fig. R-8.A).

El análisis de los niveles de proteína en extractos totales de colon de los diferentes genotipos mostró que, contrariamente a lo observado en los niveles de mRNA, la expresión de β -catenina disminuyó tras el tratamiento. Aunque esta disminución fue mucho más marcada en el caso de los ratones p38 γ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} (Fig. R-8.B).

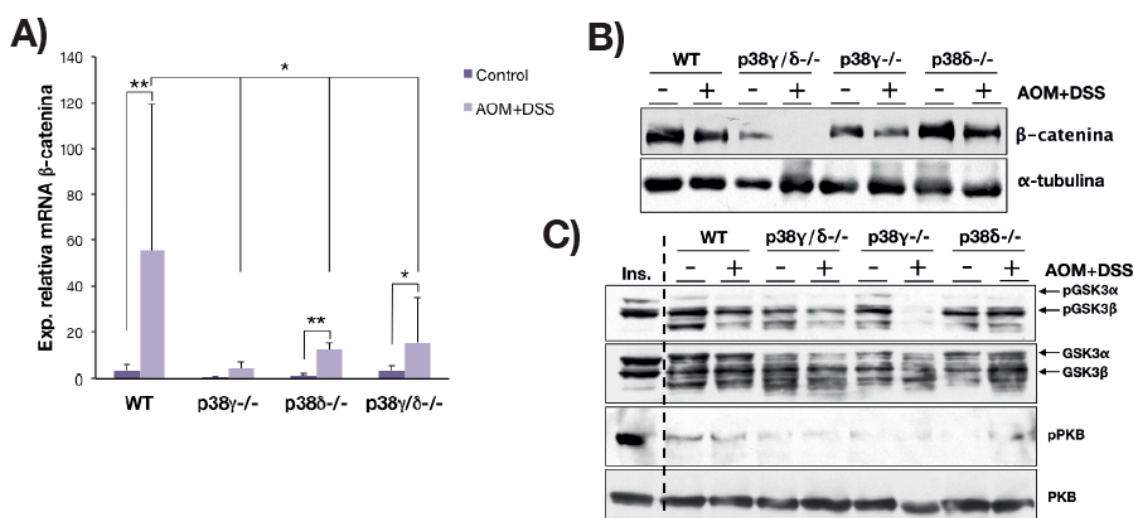


Fig. R-8. Análisis de los niveles de mRNA y de expresión de la proteína β -catenina tras el tratamiento con AOM/DSS. **A)** Representación gráfica de los niveles de expresión de mRNA de β -catenina en ratones wt ($n_{\text{total}}=23$), p38 γ ^{-/-} ($n_{\text{total}}=8$), p38 δ ^{-/-} ($n_{\text{total}}=9$) y p38 γ/δ ^{-/-} ($n_{\text{total}}=20$) en condiciones control (sin tratamiento) y tras el tratamiento con AOM/DSS. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. **B)** WB representativo de los niveles de proteína β -catenina en extractos totales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados con AOM/DSS (+) o sin tratamiento (-). Se muestran los niveles de proteína α -tubulina, como control de carga de la electroforesis en nuestras condiciones experimentales. **C)** WBs representativos de los niveles totales y fosforilados de las proteínas GSK3 α/β y PKB, estudiados en extractos totales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} en condiciones control (-) o tratados con AOM/DSS (+). Se muestra un control positivo de fosforilación de GSK3 α/β y PKB, en el que se utilizaron células HEK293 estimuladas con insulina (10mM) durante 10 minutos (Ins.).

Los niveles de β -catenina en el citoplasma celular están regulados mediante fosforilación por GSK3. La β -catenina no fosforilada se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo donde se une a factores de transcripción (Staal *et al.*, 2002).

La proteína GSK3 fosforilada es inactiva y no fosforila a β -catenina, por lo que analizamos la actividad de esta quinasa en nuestras condiciones experimentales. La fosforilación basal de GSK3 es similar en todos los genotipos, pero tras el tratamiento con AOM/DSS hay un marcado descenso en los ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-8.C), que coincide con la bajada de los niveles de la proteína β -catenina (Fig. R-8.B). Los niveles totales de proteína GSK3 son iguales en todas las condiciones experimentales (Fig. R-8.C). También analizamos el estado de fosforilación y total de la proteína PKB, una de las principales proteínas reguladoras de la actividad de GSK3, al regular su estado fosforilado. Observamos que no hubo fosforilación de PKB en ninguno de los genotipos, independientemente del tratamiento, y que los niveles totales de PKB fueron iguales en todos los genotipos en nuestras condiciones experimentales (Fig. R-8.C).

STAT3.

El análisis de la proteína STAT3 se realizó midiendo su estado de fosforilación y sus niveles totales mediante WB en nuestras condiciones experimentales. En la figura R-9 se muestran WB representativos en los que se observa un aumento de la fosforilación de STAT3 tras el tratamiento con AOM/DSS, que es independiente del genotipo. Además, los niveles totales de proteína fueron iguales en todas las condiciones.

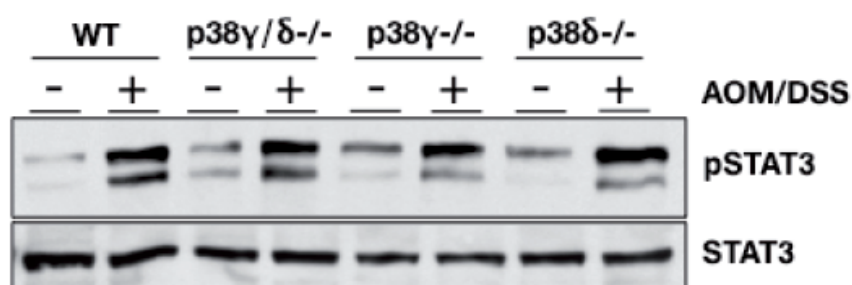


Fig. R-9. Niveles de expresión y fosforilación de STAT3 tras el tratamiento con AOM/DSS. WBs representativo del grado de expresión y fosforilación de la proteína STAT3, analizados en extractos totales de colon de ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ en condiciones control (-) o tratados con AOM/DSS (+).

COX2.

La proteína COX2 se estudió en animales wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ tratados o no con AOM/DSS mediante diferentes aproximaciones: midiendo los niveles de mRNA, cuantificando células positivas para COX2 mediante inmunofluorescencia y valorando los niveles de COX2 por WB (Fig. R-10).

Los niveles de mRNA de COX2 mostraron un aumento en los ratones $p38\gamma^{-/-}$ y wt tras el tratamiento con AOM/DSS, siendo éste mucho más acusado en los $p38\gamma^{-/-}$ (Fig. R-10.A).

También se hizo una valoración histológica mediante inmunofluorescencia, para detectar la presencia de la proteína COX2 en el tejido de colon. En la figura R-10.B se muestran secciones representativas de dichas tinciones. La cuantificación de las células positivas para COX2 mostró un aumento estadísticamente significativo, tras el tratamiento con AOM/DSS, en los ratones $p38\gamma^{-/-}$ con respecto a los ratones wt (Fig. R-10.C)

También se examinó la expresión de la proteína COX2 en extractos totales de tejido de colon de ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, tratados o no con

AOM/DSS (Fig. R-10.D). Sólo se detectó COX2 en los extractos de animales $p38\gamma^{-/-}$ tras haber sido sometidos a tratamiento.

Por tanto, todos nuestros resultados muestran que la falta de $p38\gamma$ provoca un aumento en los niveles de COX2 tras el tratamiento con AOM/DSS.

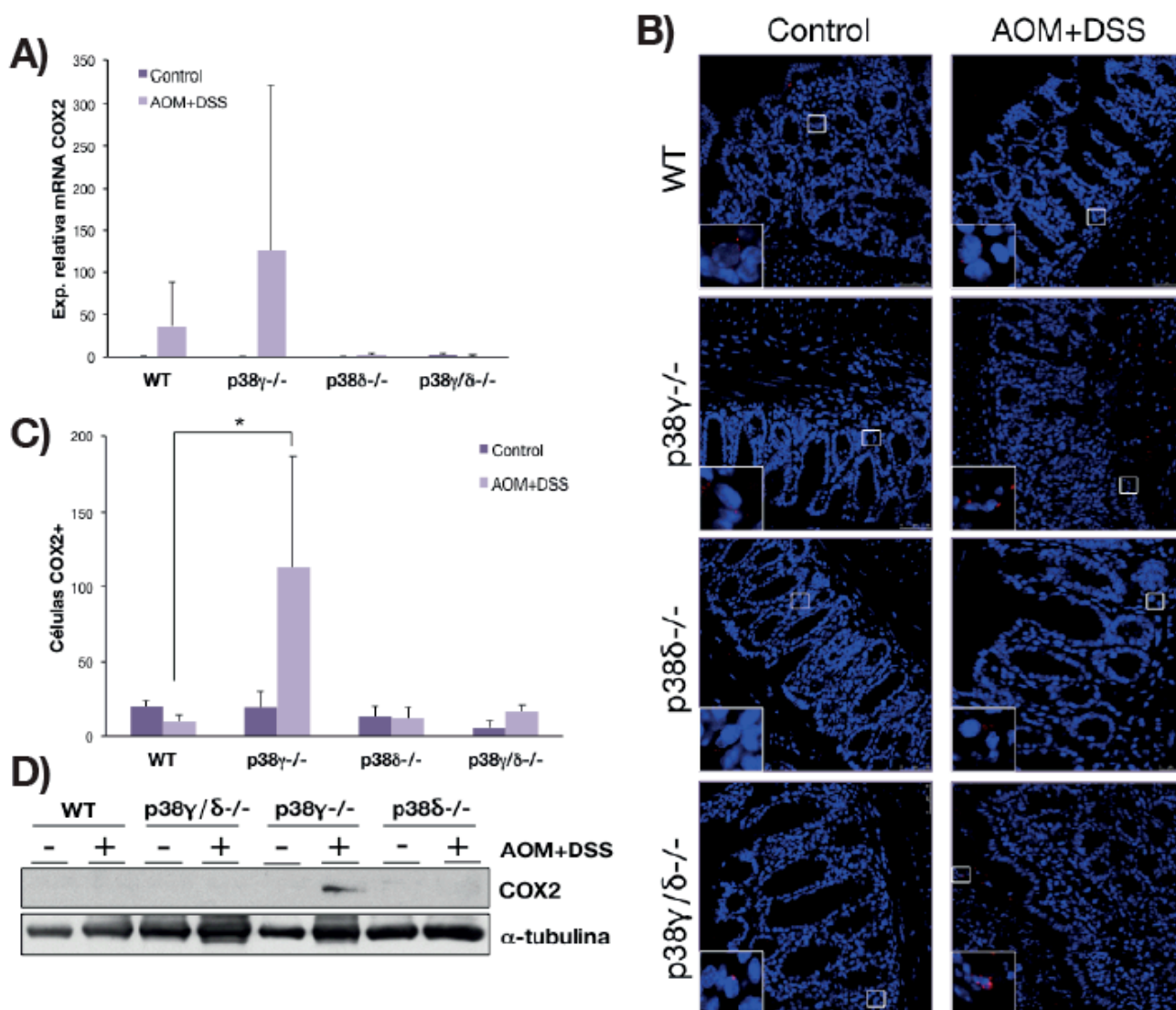


Fig. R-10. Estudio de la expresión de COX2 en el colon de ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento o no con AOM/DSS. A) Representación gráfica de los niveles de mRNA de COX2 en ratones wt ($n_{total}=19$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{total}=8$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{total}=9$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{total}=16$) y en las diferentes condiciones experimentales. **B)** Secciones de colon de los diferentes genotipos utilizados en el ensayo teñidas mediante histoinmunofluorescencia con un anticuerpo anti-COX2 (rojo), en condiciones control y tras el tratamiento. En azul aparecen los núcleos celulares teñidos con Hoechst. **C)** Representación gráfica de la cuantificación realizada sobre las secciones histológicas de ratones wt ($n_{total}=6$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{total}=6$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{total}=6$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{total}=6$), de células positivas para COX2. Por cada ratón analizado se contaron 30 campos. * $p < 0.05$. **D)** WB representativo de los niveles de proteínas COX2 en ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, tratados (+) o no (-) con AOM/DSS.

MMP9.

Con la metaloproteína MMP9 se hizo un abordaje semejante al realizado con la proteína COX2, midiendo los niveles de mRNA y cuantificando las células positivas para el marcaje fluorescente anti-MMP9 (Fig. R-11).

Los niveles de mRNA de MMP9 aumentaron significativamente, tras el tratamiento con AOM/DSS, en todos los genotipos (Fig. R-11.A). Este aumento, en

los ratones wt, fue mayor que en los $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, pero sólo entre los animales wt y los $p38\gamma^{-/-}$ las diferencias fueron estadísticamente significativas.

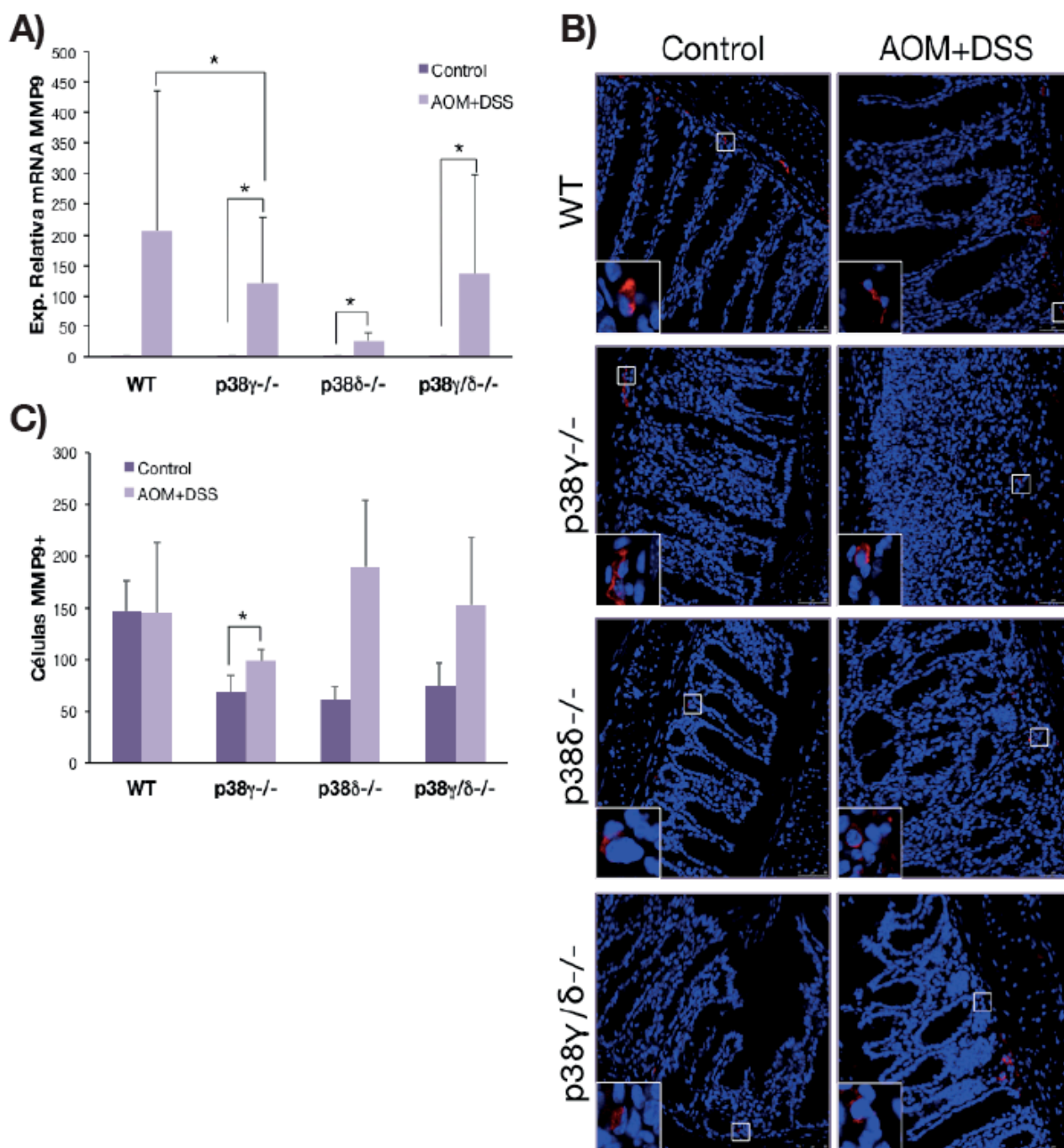


Fig. R-11. Análisis de la expresión de los niveles de mRNA y de proteína MMP9, expresada en el tejido de colon, con y sin tratamiento con AOM/DSS. A) Representación gráfica de los niveles de mRNA de MMP9 en extractos de colon de ratones wt ($n_{\text{total}}=17$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=8$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=9$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=16$) en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS. * $p<0,05$. **B)** Secciones representativas de colon teñidas mediante histoinmunofluorescencia con un anticuerpo anti-MMP9 (rojo), en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS, en los cuatro genotipos. En azul aparecen los núcleos celulares teñidos con Hoechst. **C)** Gráfica de la cuantificación realizada de células positivas para MMP9, sobre la secciones histológicas de ratones wt ($n_{\text{total}}=6$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$) tratados o no con AOM/DSS. Por cada ratón analizado se contaron 30 campos. * $p<0,05$.

También se realizaron tinciones histológicas de secciones de colon (Fig. R-11.B) y se cuantificaron las células positivas para MMP9 (Fig. R-11.C). En

condiciones basales el número de células que expresan MMP9 en ratones wt es sensiblemente mayor que en el resto de genotipos. Además, el tratamiento con AOM/DSS no afectó a los niveles de células positivas para MMP9 en los ratones wt, mientras que en el resto de genotipos ($p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$), los niveles aumentaron con el tratamiento (Fig. R-11.C).

En conclusión, nuestros resultados muestran que hay un aumento en los niveles de MMP9 a nivel de mRNA y de proteína en ratones $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ que han sido tratados con AOM/DSS. En el caso de los animales wt, el número de células que expresan MMP9 en condiciones basales es mayor que en el resto de genotipos y además, no aumentan con el tratamiento.

1.4.2. Niveles de mRNA de citoquinas relacionadas con CAC.

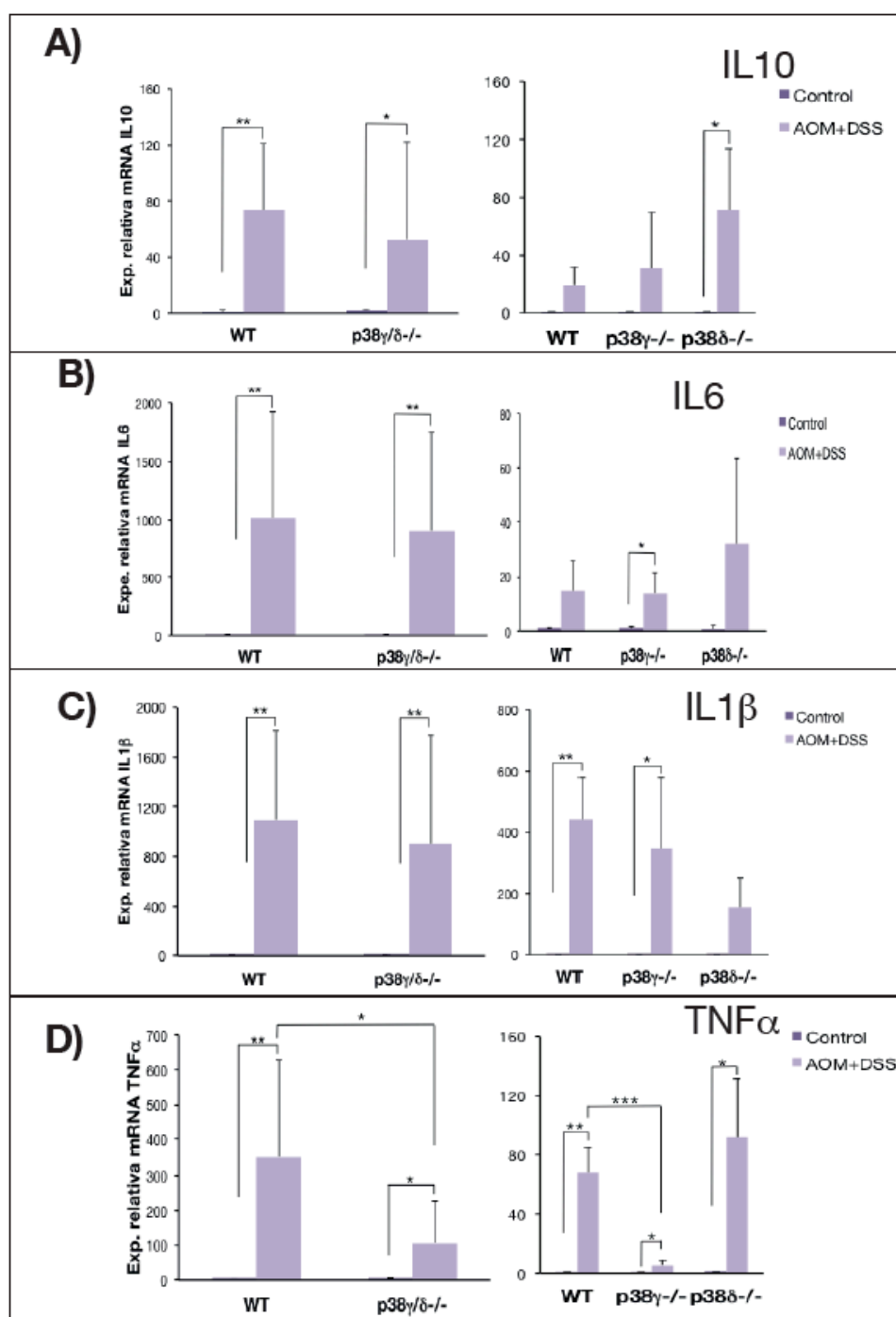


Fig. R-12. Niveles de expresión de mRNA de citoquinas pro- y anti-inflamatorias tras el tratamiento con AOM/DSS. Representación gráfica de la expresión de mRNA de IL10 (A), IL6 (B), IL1 β (C) y TNF α (D) medidos en extractos totales de colon de ratones wt ($n_{total}=14/ n_{total}=5$), p38 $\gamma^{-/-}$ ($n_{total}=8$), p38 $\delta^{-/-}$ ($n_{total}=8$) y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{total}=16$) en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Los niveles de mRNA de citoquinas anti- y pro-inflamatorias, se analizaron en muestras procedentes de animales wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tratados o no con AOM/DSS (Fig. R-12). Las citoquinas que se valoraron fueron IL1 β , TNF α , IL6 e IL10.

Se observó un aumento, estadísticamente significativo, en la producción de la mayoría de las citoquinas tras el tratamiento con AOM/DSS en los cuatro genotipos (Fig. R-12). En el caso de la citoquina anti-inflamatoria IL10, este incremento fue similar en los cuatro genotipos, aunque sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en los ratones wt, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-12.A). El mismo resultado se observó con los niveles de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL1 β (Fig. R-12.B, R-12.C), aunque la producción de esta última, en los ratones p38 $\delta^{-/-}$, es ligeramente menor que en el resto de los genotipos. Por otro lado, el incremento en la producción de TNF α , tras el tratamiento, fue significativamente menor en los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ con respecto a los ratones wt (Fig. R-12.D), sugiriendo la implicación de p38 γ en la expresión de la citoquina pro-inflamatoria TNF α .

1.4.3. Células inmunes implicadas en CAC: macrófagos, neutrófilos y linfocitos.

Macrófagos.

Para analizar la infiltración de macrófagos en el colon de ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, tratados con AOM/DSS y control, se realizaron tinciones de secciones histológicas utilizando un anticuerpo frente al marcador específico de superficie F4/80 y se cuantificaron las células positivas para F4/80 (F4/80 $^{+}$) (Fig. R-13).

El número de células F4/80 $^{+}$ en condiciones basales (control) fue similar en todos los genotipos (Fig. R-13.B). Tras el tratamiento, se observó un aumento en el número de células F4/80 $^{+}$ en todos los genotipos, pero éste fue mayor en el caso de los ratones p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ al compararlos con los wt. Además, este incremento fue estadísticamente significativo en los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. También, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales wt y los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento (Fig. R-13.B).

Estos resultados indican que existe una mayor infiltración de macrófagos, tras el tratamiento con AOM/DSS, en ratones deficientes en p38 γ y/o p38 δ .

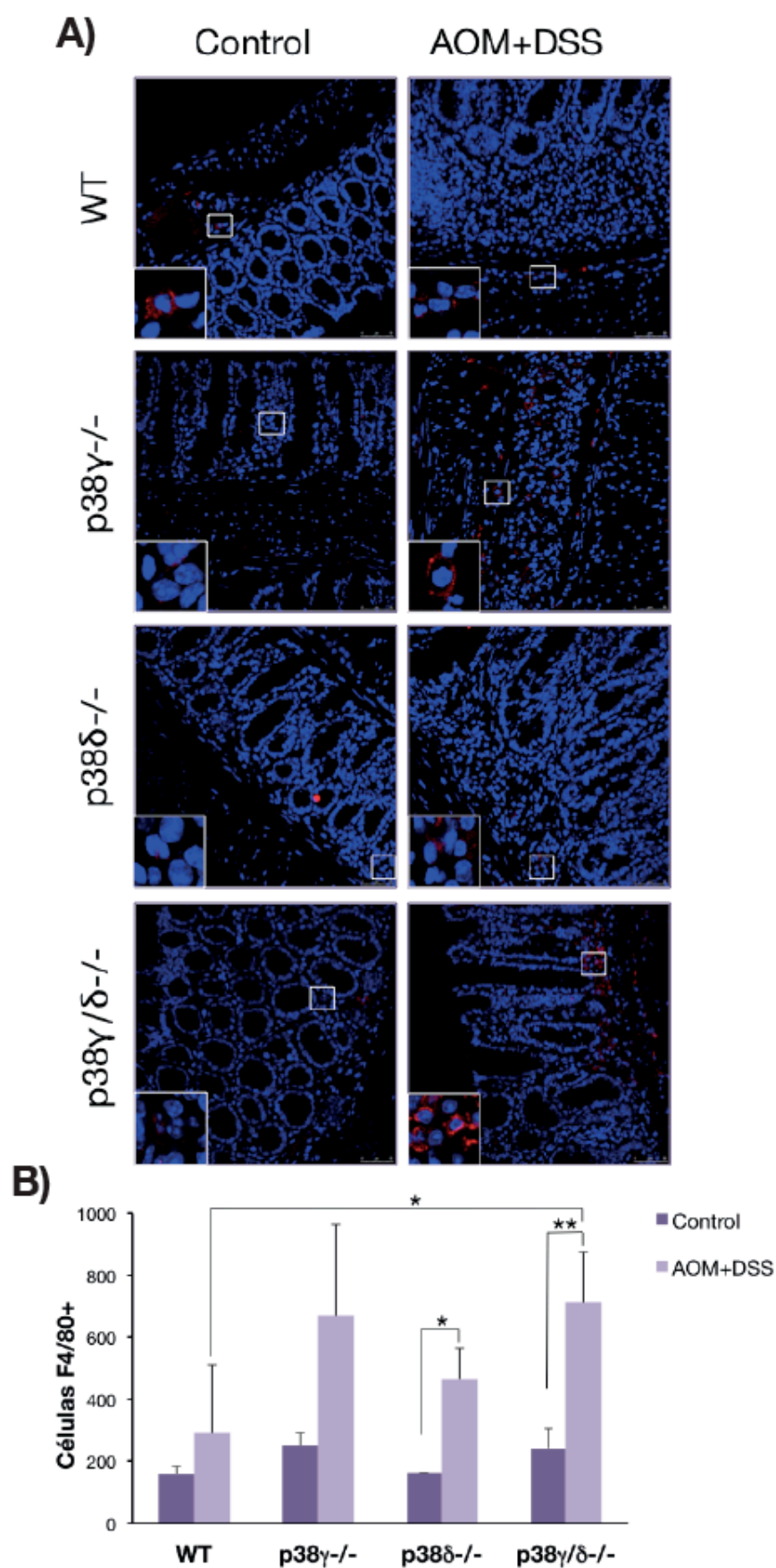


Fig. R-13. Infiltración de macrófagos en el tejido de colon. A) Secciones representativas del colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS, teñidas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-F4/80 (rojo) y con un tinte específico de núcleo como es

el Hoechst (azul). **B)** Gráfica de la cuantificación realizada de células F4/80⁺, sobre secciones histológicas de ratones wt ($n_{\text{total}}=6$), p38 $\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$), p38 $\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$) y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=6$), tratados o no con AOM/DSS. Por cada ratón analizado se cuantificaron 30 campos. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Neutrófilos.

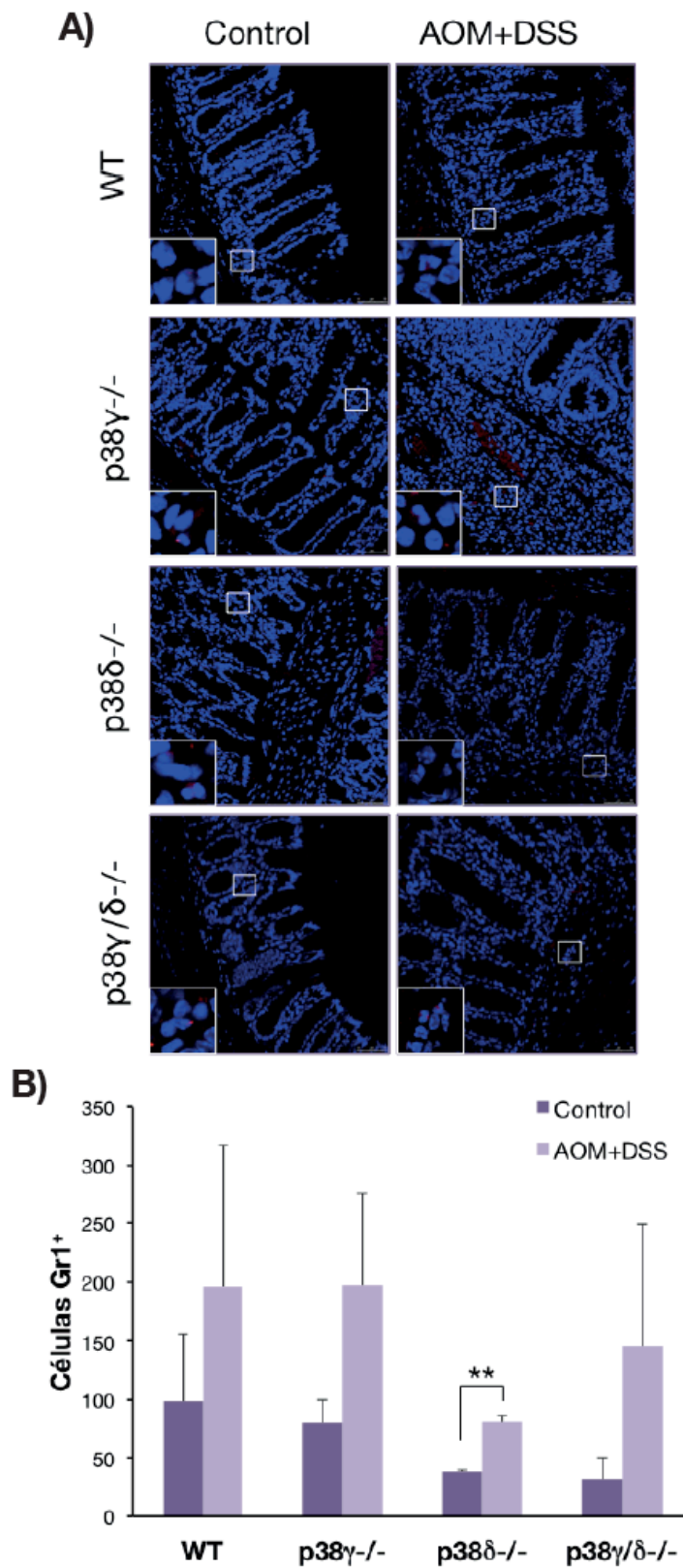


Fig. R-14. Infiltración de neutrófilos en el tejido de colon. A) Secciones representativas del colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS, teñidas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Gr1 (rojo) y con un tinte específico de núcleo como es el Hoechst (azul). **B)** Gráfica de la cuantificación realizada de células Gr1⁺, sobre secciones histológicas de ratones wt (n_{total}=6), p38 γ ^{-/-} (n_{total}=6), p38 δ ^{-/-} (n_{total}=6) y p38 γ/δ ^{-/-} (n_{total}=6), tratados o no con AOM/DSS. Por cada ratón analizado se cuantificaron 30 campos. **p<0,01.

La infiltración de neutrófilos se examinó igual que la de macrófagos, pero utilizando el anticuerpo frente al marcador específico de superficie Gr1 (Fig. R-14).

Las células positivas para Gr1 (Gr1⁺) se cuantificaron a partir de las secciones histológicas teñidas mediante fluorescencia (Fig. R-14.A). Se observó que en todos los genotipos hubo un aumento en la infiltración de células Gr1⁺ tras el tratamiento (Fig. R-14.B). Sin embargo, el número total de células Gr1⁺ en el colon de ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} fue ligeramente menor que en el caso de los animales wt y p38 γ ^{-/-}, tras el tratamiento con AOM/DSS (Fig. R-14.B).

Estos resultados sugieren que la falta de p38 δ produce un defecto en la infiltración de neutrófilos.

Linfocitos.

Las cuantificaciones de la infiltración de linfocitos en el colon de ratones tratados o no con AOM/DSS se realizó como hemos descrito para macrófagos y neutrófilos, pero utilizando un anticuerpo específico frente al marcador de superficie CD3 (Fig. R-15).

A partir de secciones de colon teñidas mediante inmunofluorescencia (Fig. R-15.A) se cuantificó el número de células CD3 positivas (CD3⁺). En la cuantificación se observó que el número de células CD3⁺ aumentaba tras el tratamiento en todos los genotipos, aunque este aumento fue más acusado en los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, siendo estadísticamente significativo en el caso de estos últimos (Fig. R-15.B).

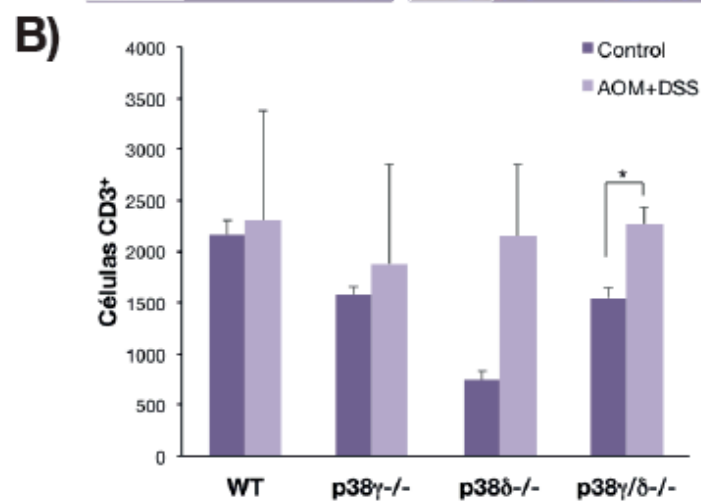
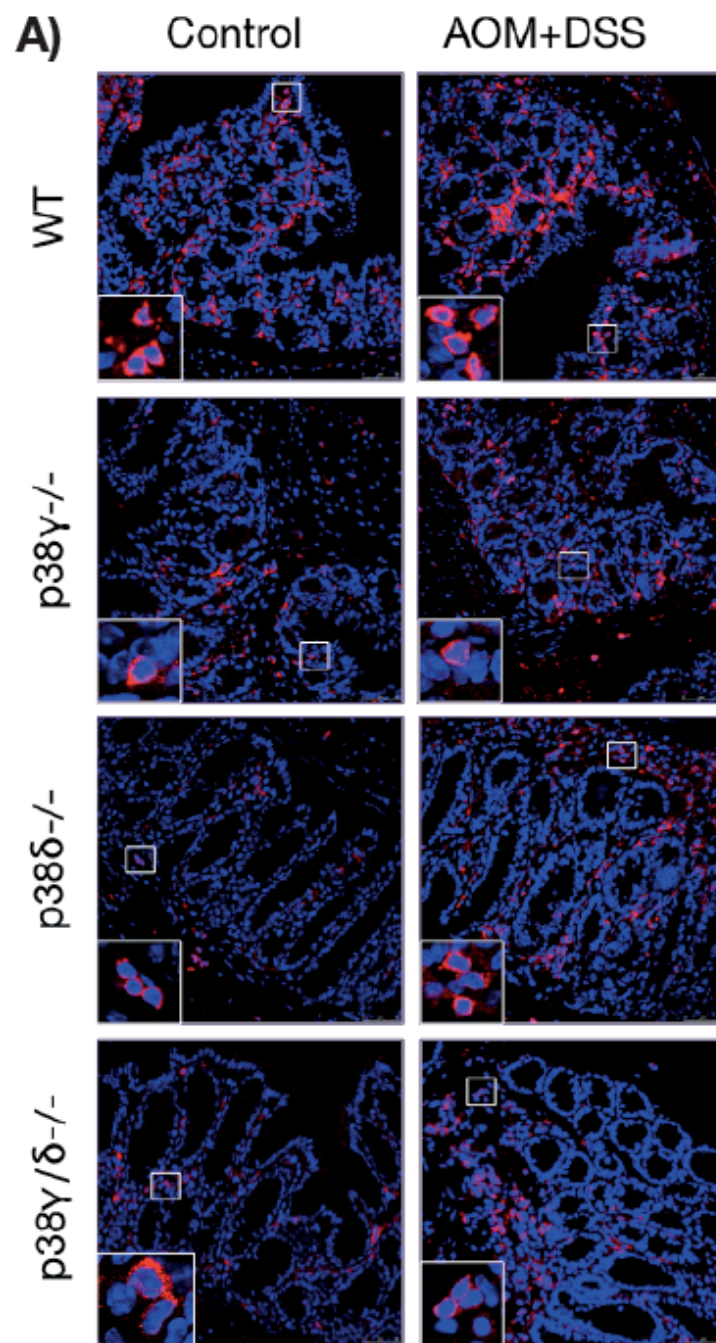


Fig. R-15. Infiltración de linfocitos en el tejido de colon. **A)** Secciones representativas del colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, en condiciones control y tras el tratamiento con AOM/DSS, teñidas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD3 (rojo) y con un tinte específico de núcleo como es el Hoechst (azul). **B)** Gráfica de la cuantificación realizada de células CD3⁺, sobre secciones histológicas de ratones wt (n_{total}=6), p38 γ ^{-/-} (n_{total}=6), p38 δ ^{-/-} (n_{total}=6) y p38 γ/δ ^{-/-} (n_{total}=6), tratados o no con AOM/DSS. Por cada ratón analizado se cuantificaron 30 campos. *p<0,05.

2. Colitis ulcerosa.

En paralelo al análisis del fenotipo de los ratones deficientes en p38 γ y/o p38 δ tras el tratamiento con AOM/DSS, quisimos también estudiar el fenotipo desarrollado por dichos animales en la situación previa al desarrollo del cáncer de colon, induciendo en los ratones una colitis ulcerosa mediante el tratamiento con DSS y su posterior recuperación. Para ello animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} fueron sometidos a diferentes condiciones de tratamiento (Fig. M-1) en función de los parámetros que quisimos estudiar.

2.1. Efectos del tratamiento con DSS.

Analizamos una serie de parámetros que se ven alterados con el tratamiento con DSS. Estos parámetros fueron: la variación de peso y la longitud del colon (Fig. R-16), el grado de daño epitelial e inflamación de la mucosa (Fig. R-17), así como la presencia de úlceras en el epitelio intestinal (Fig. R-18).

2.1.1. Variación de peso y de la longitud del colon.

La variación de peso, así como la de la longitud del colon, se evaluó durante el tratamiento de los animales con DSS. El tratamiento consistió en una primera fase en la que se administró DSS (3%) durante 5 días y una segunda fase de recuperación, sin DSS (Materiales y métodos 3.1).

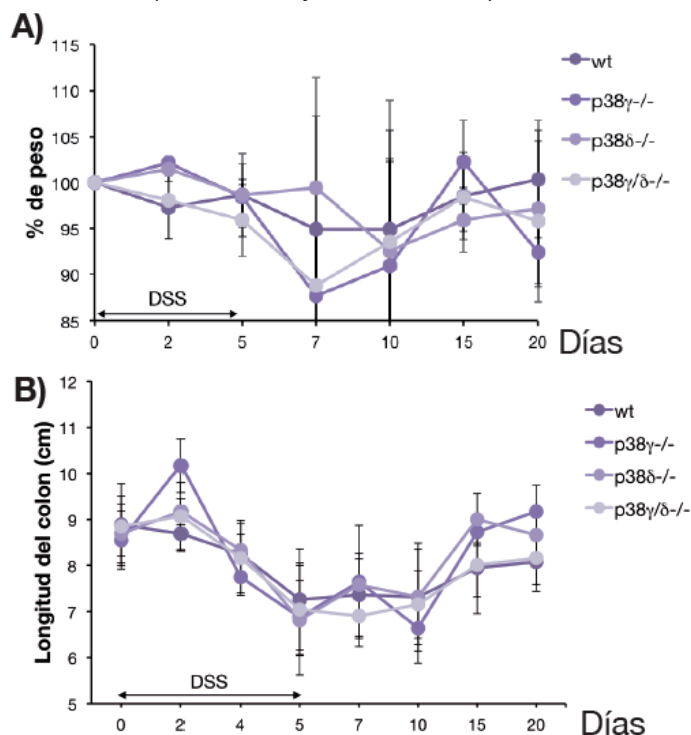


Fig. R-16. Seguimiento en la variación del peso y de la longitud del colon, a lo largo del tratamiento con DSS y posterior recuperación, en ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}. **A)** Porcentajes de aumento o pérdida de peso a lo largo del tratamiento con DSS en ratones wt (n_{total}=113), p38 γ ^{-/-} (n_{total}=63), p38 δ ^{-/-} (n_{total}=56) y

p38 γ / $\delta^{-/-}$ ($n_{total}=101$). B) Variación en la longitud del colon (cm) de los ratones wt ($n_{total}=119$), p38 $\gamma^{-/-}$ ($n_{total}=62$), p38 $\delta^{-/-}$ ($n_{total}=59$) y p38 γ / $\delta^{-/-}$ ($n_{total}=107$) a lo largo del tratamiento con DSS.

Tanto en el caso de la variación del peso (Fig. R-16.A) como en la de la longitud del colon (Fig. R-16.B), observamos un descenso durante los primeros días de tratamiento. Esta bajada fue máxima entre los días 5 y 10 de tratamiento. A días posteriores, el peso y la longitud del colon vuelven a recuperar valores iniciales. En ningún caso se observaron diferencias significativas en el patrón de bajada y recuperación de ambos parámetros al comparar los diferentes genotipos.

2.1.2. Valoración del daño epitelial y de la inflamación de la mucosa.

Otros parámetros que se estudiaron para analizar el grado de sensibilidad al tratamiento de los diferentes genotipos, fue evaluar el grado de daño epitelial, así como el grado de inflamación de la mucosa, siguiendo unas escalas semi-cuantitativas descritas en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. En estas escalas se valoraron entre otros factores la presencia de focos de inflamación, la infiltración de células inflamatorias y la presencia de úlceras.

En la figura R-17.A se muestran secciones de colon teñidas con H&E de animales wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$, antes (0 días), durante (5 días) y tras (10 días) el tratamiento con DSS. En todos los genotipos podemos observar una proliferación anómala de las células del epitelio intestinal (displasia), a los 10 días del inicio del tratamiento (Fig. R-17.A, tercera columna). Los animales p38 $\gamma^{-/-}$ fueron los primeros en mostrar displasia epitelial. Además, el grado de ésta es mayor que en el resto de genotipos a los 10 días.

Al evaluar el grado de daño en el epitelio intestinal (Fig. R-17.B), así como de la inflamación de la mucosa (Fig. R-17.C), encontramos que de forma espontánea ninguno de los ratones presentaba daño o inflamación, por lo que el grado de estos dos parámetros a día 0 de tratamiento es 0. Tras 5 días de tratamiento, observamos que el grado de daño en los distintos genotipos oscilaba entre 2.5 y 3.5 (Fig. R-17.A), correspondiendo el máximo valor a los animales p38 $\gamma^{-/-}$. Además, los ratones wt y p38 $\delta^{-/-}$ presentaban un comportamiento muy semejante a lo largo del ensayo. Presentando un grado de daño mayor a los 10 días de tratamiento que a los 5 (Fig. R-17.A). Por otro lado, los animales p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentaron un daño mayor a los 5 días, que bajó ligeramente, a los 10 días del inicio del tratamiento.

Cuando analizamos la inflamación de la mucosa (Fig. R-17.C), observamos que a los 5 días de tratamiento los ratones p38 $\delta^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentaban un grado de inflamación significativamente menor que el de los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ (Fig. R-17.C). A los 10 días del inicio del tratamiento, el grado de inflamación aumentó en todos los genotipos salvo en wt. Además, encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la inflamación entre los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$, a los 10 días del tratamiento con DSS.

En conclusión, podemos decir que en respuesta al tratamiento con DSS, los animales deficientes en p38 γ presentan un grado de displasia y de daño epitelial mayor, si los comparamos con el resto de genotipos.

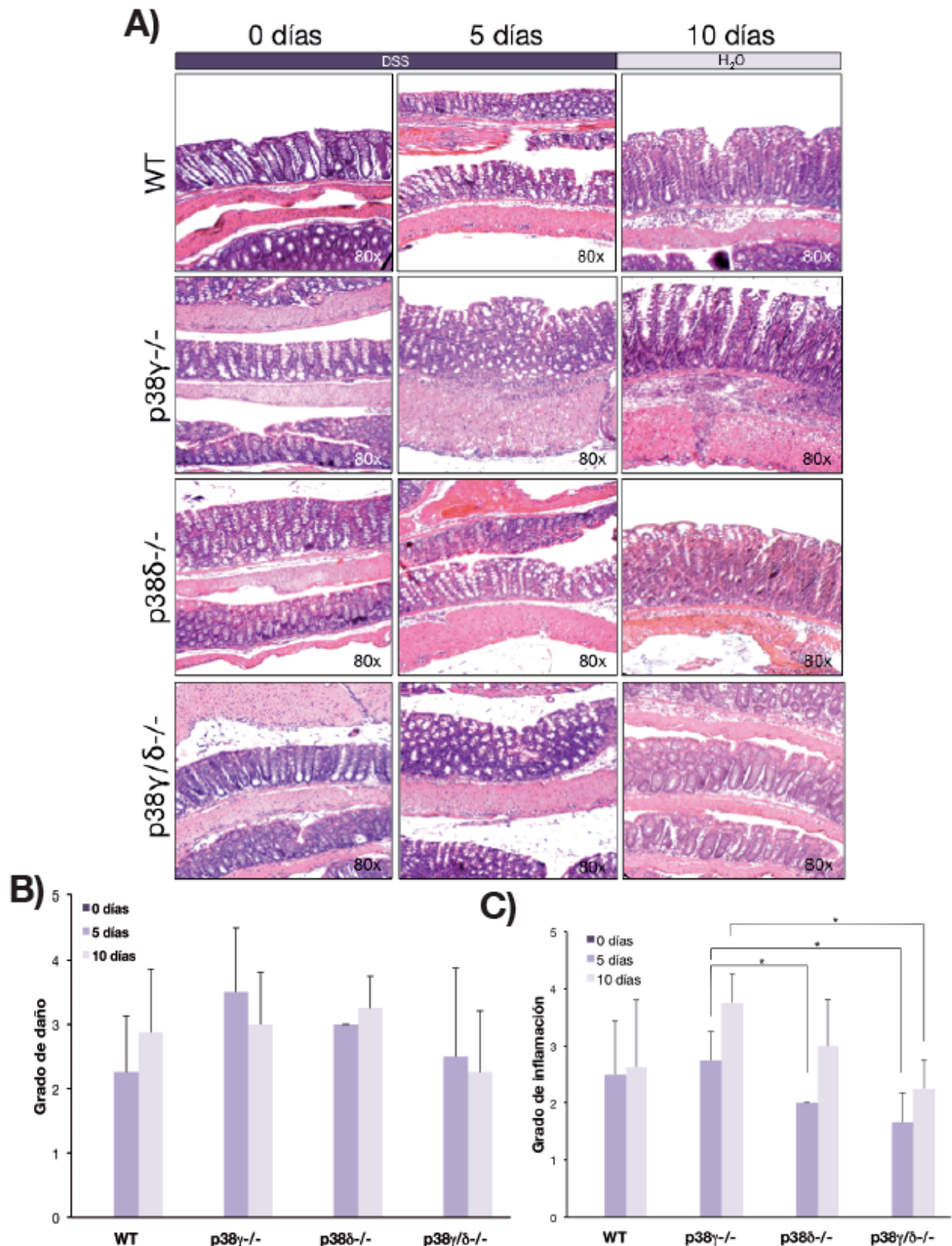


Fig. R-17. Valoración histopatológica del grado de daño epitelial y el grado de inflamación de la mucosa intestinal tras el tratamiento con DSS. A) Secciones representativas, teñidas con H&E, de la mucosa intestinal de ratones wt, p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ a los 0, 5 y 10 días del inicio del tratamiento con DSS. **B)** Valoración del grado de daño epitelial analizado en ratones wt ($n_{\text{total}}=24$), p38 $\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$), p38 $\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$) y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=14$) a los 0, 5 y 10 días del tratamiento con DSS. La escala de valoración utilizada fue la siguiente, de 0 a 4: 0= no hay evidencias de daño epitelial, 1= lesiones epiteliales ocasionales, 2= 1-2 focos de ulceración, 3= menos de 5 focos de ulceración, 4= más de 5 focos de ulceración. **C)** Valoración del grado de inflamación de la mucosa analizado en ratones wt

($n_{\text{total}}=24$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=14$) a los 0, 5 y 10 días del tratamiento con DSS. La escala de valoración utilizada fue la siguiente, de 0 a 4: 0= no hay evidencias de inflamación, 1= bajo nivel de inflamación con infiltración dispersa de células mononucleares, 2= inflamación moderada con múltiples focos, 3= alto nivel de inflamación con incremento de la densidad vascular y marcado adelgazamiento de la pared y 4= inflamación altamente severa, con infiltración trans-mural de leucocitos y pérdida de células caliciformes. * $p<0,05$.

2.1.3. Aparición de úlceras.

También valoramos la presencia y el tamaño en superficie de las úlceras epiteliales aparecidas tras el tratamiento con DSS y posterior recuperación (Fig. R-18).

En la figura R-18.A se muestran secciones representativas de colon, teñidas con H&E, de los diferentes genotipos ensayados. Además, en las secciones se indican las úlceras valoradas, así como la presencia de focos de inflamación encontrados a lo largo del tratamiento.

Cuando analizamos el número de úlceras en los diferentes genotipos (Fig. R-20.B), observamos que todos ratones presentaban un número muy semejante a los 5 días de tratamiento (entorno a 5 úlceras por ratón). Pero tras 10 días de tratamiento, el número de úlceras aumentaba en los animales wt, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, mientras que en el caso de los animales carentes en $p38\gamma$ disminuye (Fig. R-20.B).

Al medir la extensión de las úlceras en superficie (Fig. R-18.C), encontramos que tanto los ratones wt como los ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\delta^{-/-}$ presentaban úlceras de tamaños similares durante el tratamiento. A los 5 días del inicio del tratamiento observamos que entorno al 75% de las úlceras estaban entre 0-1 mm, entorno al 17% estaban entre 1-2 mm y que entorno al 7% de las úlceras estaban por encima de los 2 mm. Tras 10 días del inicio del ensayo, encontramos un 50% de úlceras con un tamaño de 0-1 mm, un 24% de entre 1 y 2 mm de extensión y entorno a un 26% de más de 2 mm. Por otro lado, el tamaño de las úlceras de los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ a los 5 y 10 días del inicio del tratamiento, fueron menores que las del resto de genotipos, no superando los 2 mm a los 5 días y presentando sólo un 8% de úlceras con un tamaño superior a los 2 mm a los 10 días (Fig. R-18.C).

Estos resultados muestran que los animales wt y $p38\delta^{-/-}$ por un lado y los animales $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ por otro, presentan un comportamiento semejante en cuanto a la aparición de úlceras y el tamaño de las mismas a lo largo del tratamiento con DSS y su posterior recuperación. Sugiriendo que la isoforma $p38\gamma$ es la responsable de que los animales presenten más úlceras y que éstas sean más grandes.

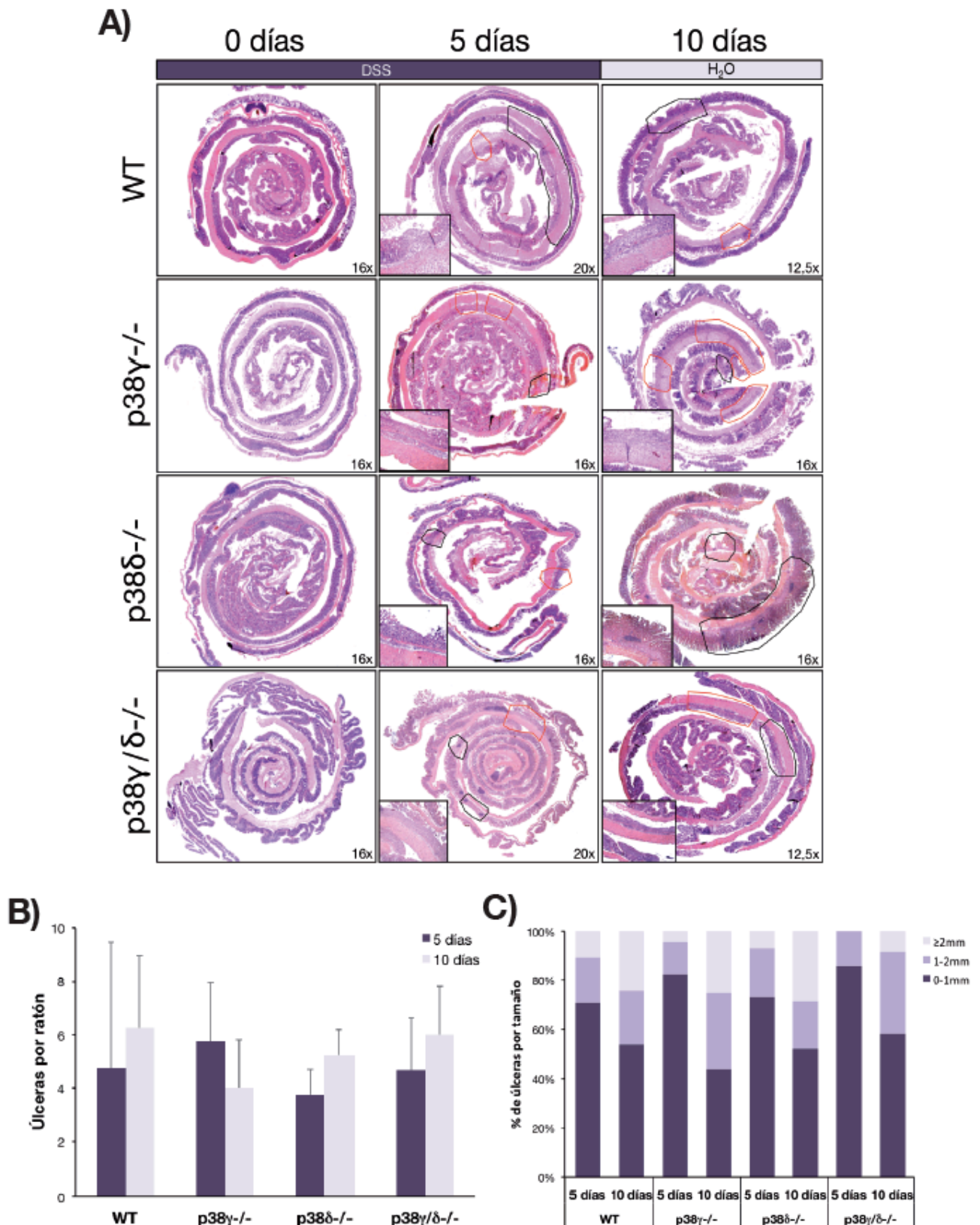


Fig. R-18. Cuantificación de las úlceras encontradas en el colon de los ratones tratados con DSS. A) Secciones representativas, teñidas con H&E, de ratones wt, p38γ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38γ/δ^{-/-} a los 0, 5 y 10 días del inicio del tratamiento con DSS. En las imágenes se indica con línea roja las úlceras encontradas y con línea negra los focos de inflamación. **B)** Cuantificación de las úlceras evaluadas en animales wt ($n_{\text{total}}=16$), p38γ^{-/-} ($n_{\text{total}}=8$), p38δ^{-/-} ($n_{\text{total}}=8$) y p38γ/δ^{-/-} ($n_{\text{total}}=10$) a los diferentes días del ensayo. **C)** Representación gráfica de los porcentajes de úlceras analizadas en función de su tamaño, medido en superficie, en ratones wt ($n_{\text{total}}=16$), p38γ^{-/-} ($n_{\text{total}}=8$), p38δ^{-/-} ($n_{\text{total}}=8$) y p38γ/δ^{-/-} ($n_{\text{total}}=10$), a los 5 y 10 días del tratamiento con DSS.

2.2. Estado de diferentes vías de señalización.

A continuación, analizamos el estado de activación de diferentes vías de señalización que podrían estar implicadas en el desarrollo de la colitis ulcerosa, en ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}. Los ratones se sometieron al protocolo de colitis que consistió en la administración de DSS al 3% hasta 5 días, y posterior recuperación (sin DSS) hasta 20 días. El análisis se realizó en extractos totales de colon, lisados totales de células epiteliales y lisados procedentes de la fragmentación celular (citósol y núcleo). Las vías de señalización que se analizaron fueron: MAPKs (p38MAPKs, ERK1/2 y JNK 1/2), NF- κ B y GSK3/ β -catenina.

2.2.1. MAPKs.

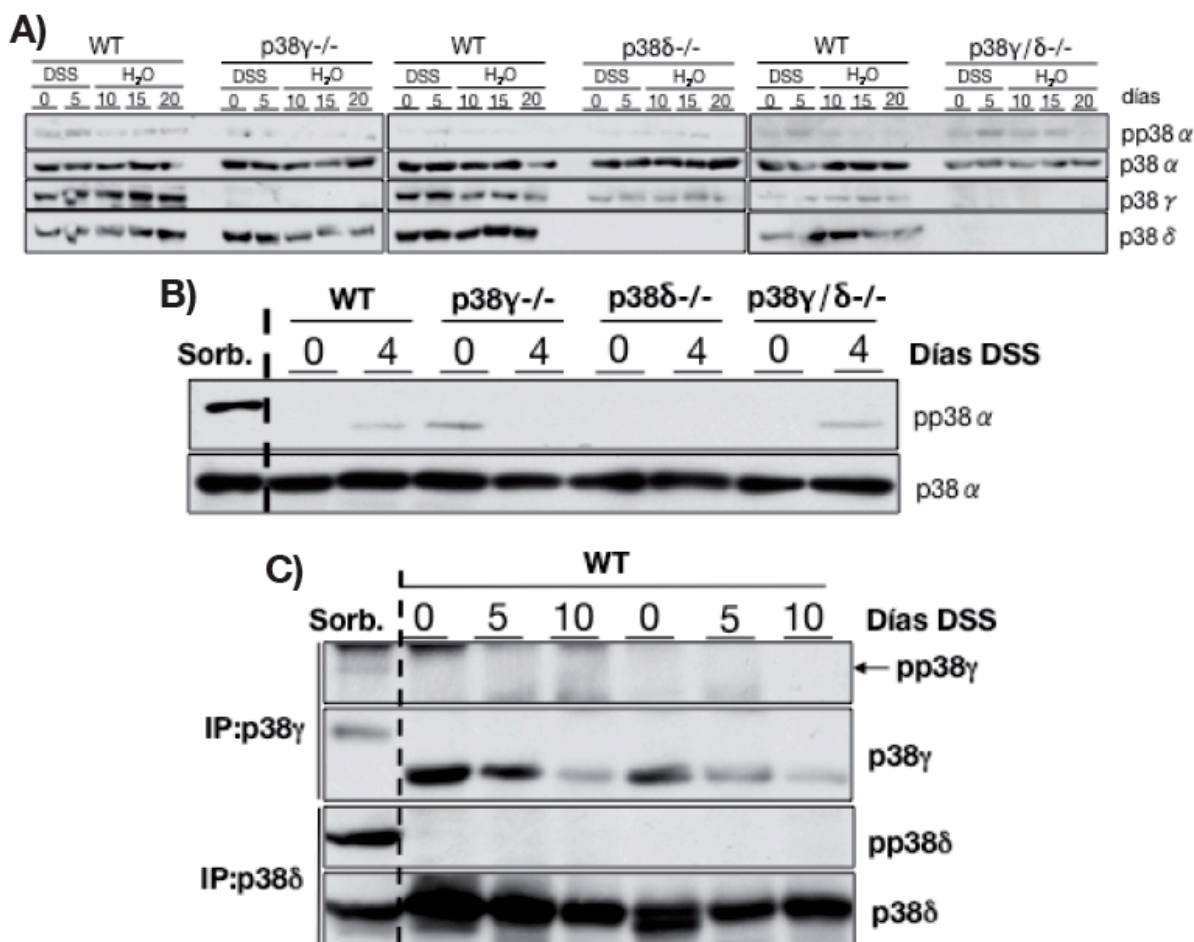


Fig. R-19. Niveles de proteína y actividad de las p38MAPKs tras el tratamiento con DSS. **A)** WBs representativos de los niveles de proteína de las cuatro isoformas de las p38MAPKs, así como de su estado de fosforilación, analizados en extractos totales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. **B)** Niveles de la proteína p38 α , así como de su estado de fosforilación, estudiados en extractos de células epiteliales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados durante 0 ó 4 días con DSS. Se muestra un control positivo de fosforilación de p38 α , en el que se utilizaron células HEK293 estimuladas con sorbitol (0,5M) durante 10 minutos (Sorb.). **C)** Inmunoprecipitación de las isoformas p38 γ y p38 δ a partir de 1mg (en cada caso) de extracto total de colon de ratones wt a los 0, 5 y 10 días del inicio del tratamiento con DSS. Posteriormente se analizaron por WB tanto los niveles de proteína como su fosforilación. Se muestra un control positivo de fosforilación de p38 γ o p38 δ , en el que se utilizaron células HEK293 estimuladas con sorbitol (0,5M) durante 10 minutos. A continuación, se inmunoprecipitó la isoforma correspondiente a partir de 1mg del extracto celular (Sorb.).

Las primeras MAPKs que se examinaron fueron las p38MAPKs (Fig. R-19). En extractos totales de colon no observamos activación de p38 α , aunque en algunos casos si se vio un ligero aumento a los 5 días de tratamiento en los animales wt y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-19.A). También estudiamos el estado de fosforilación de p38MAPKs en lisados de células epiteliales de ratones que fueron tratados con DSS durante 4 días (Fig. R-19.B). Observamos que había otra vez una ligera fosforilación en las células procedentes de animales wt y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento (Fig. R-19.B). Además, para comprobar si p38 γ y p38 δ se activaban tras el tratamiento, se inmunoprecipitaron ambas proteínas a partir de 1mg de extractos totales de colon de animales wt y analizamos su fosforilación por WB (Fig. R-19.C). Al igual que para la p38 α , no observamos fosforilación en ninguna de las dos isoformas.

ERK1/2 presentó una fosforilación basal en todos los genotipos (Fig. R-20.A). En los animales wt y p38 $\delta^{-/-}$ observamos un ligero incremento en la activación de estas proteínas a los 5 días del tratamiento con DSS y un descenso a los 10 días. En el caso de los ratones p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, el incremento en la fosforilación de ERK1/2 no se produce, pero si se da el descenso observado a los 10 días en los ratones wt y p38 $\delta^{-/-}$ (Fig. R-20.A). Sorprendentemente, en los ratones wt y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, la fosforilación de ERK1/2 vuelve a aumentar a los 15 días del tratamiento y vuelve a bajar a los 20 días. Los niveles totales de ERK1/2 son similares en todos los genotipos y no varían a lo largo del tratamiento (Fig. R-20.A). También, se analizó la fosforilación de ERK1/2 en células del epitelio intestinal de ratones que fueron tratados o no con DSS (Fig. R-20.B). Los niveles totales de ERK1/2 en estas células fueron iguales en todas las condiciones experimentales. En las células wt y p38 $\delta^{-/-}$ encontramos un aumento en la activación de ERK1/2 a los 4 días del tratamiento, mientras que en las células p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, esa activación no ocurre (Fig. R-20.B). Estos resultados confirman las diferencias de fosforilación de ERK1/2, tras el tratamiento, observadas en extractos totales de colon de los diferentes genotipos (Fig. R-20.A).

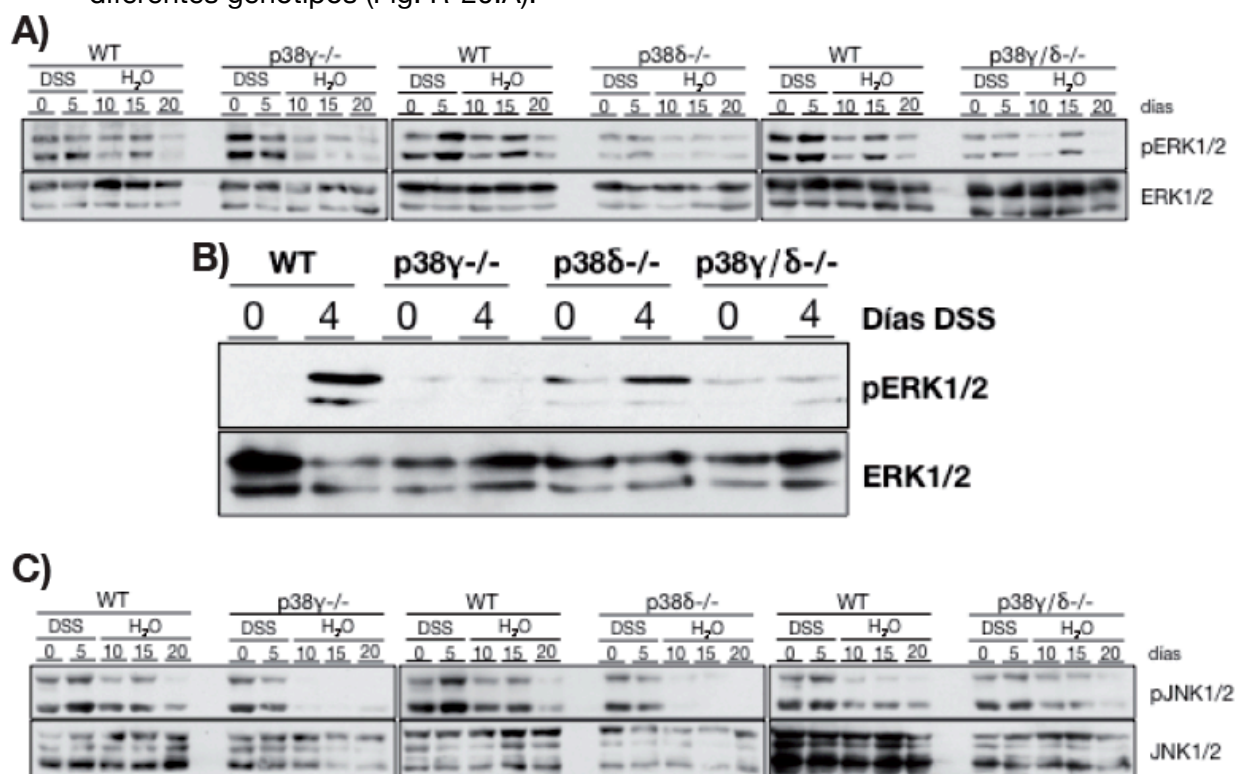


Fig. R-20. Niveles de proteína y actividad de ERK1/2 y JNK1/2 tras el tratamiento con DSS. A) WBs representativos de los niveles de proteína ERK1/2 y de su estado de fosforilación, en extractos totales de

colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. **B)** Niveles del estado de fosforilación y de proteína ERK1/2, en extractos de células epiteliales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados durante 0 ó 4 días con DSS. **C)** WBs representativos de los niveles de proteína JNK1/2 y de su estado de fosforilación, en extractos totales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS.

Al igual que con ERK1/2, JNK1/2 presentó una fosforilación basal alta en todos los genotipos (Fig. R-20.D). En los animales wt, observamos un incremento en la fosforilación de estas proteínas a los 5 días del tratamiento con DSS y, un descenso en días posteriores, llegando a niveles por debajo del basal. Por el contrario, en los ratones p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} no observamos un incremento en la fosforilación a los 5 días, pero si un descenso a lo largo del tratamiento. Los niveles totales de estas quinasas son similares en todos los genotipos y no variaron a lo largo del tratamiento (Fig. R-20.D).

2.2.2. NF- κ B.

Otra de las vías de señalización que analizamos fue la del factor de transcripción NF- κ B. Para ello examinamos los niveles del inhibidor I κ B- α en extractos totales de colon (Fig. R-21.A) y los niveles de NF- κ B en fracciones de células del epitelio intestinal (citoplasma y núcleo) de ratones que fueron tratados o no con DSS (Fig. R-21.B).

A)



B)

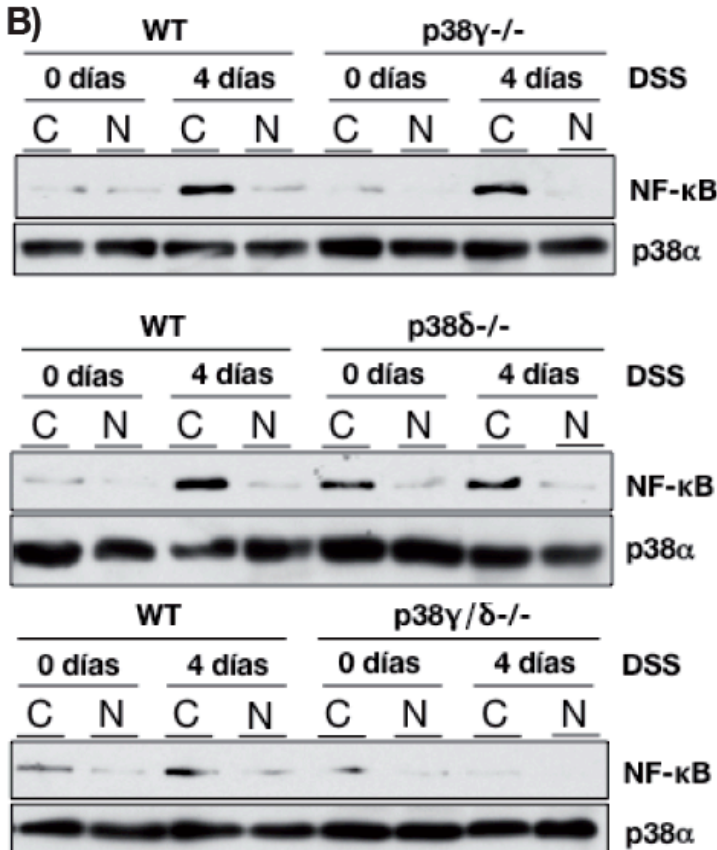


Fig. R-21. Estudio de la vía de señalización de NF- κ B en el colon de ratones tratados con DSS. A) WBs representativos de los niveles de proteína I κ B- α en extractos totales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. Se muestran los niveles de proteína α -tubulina, como control de carga de la electroforesis en nuestras condiciones experimentales. **B)** WBs de los niveles de proteína NF- κ B analizados en fracciones celulares (citósol y núcleo) de células epiteliales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados con DSS durante 0 ó 4 días. Se muestran los niveles de proteína α -tubulina, como control de carga de la electroforesis en nuestras condiciones experimentales.

En extractos totales de colon, no observamos una clara variación en los niveles de I κ B- α a lo largo del tratamiento y en ninguno de los genotipos (Fig. R-21.A). Por otro lado, al analizar los niveles de NF- κ B en las fracciones celulares, observamos que, tras el tratamiento, los niveles totales de NF- κ B aumentaron en las células wt, p38 γ ^{-/-} y p38 δ ^{-/-}. Por el contrario, en las células p38 γ/δ ^{-/-} los niveles no se vieron afectados por el tratamiento con DSS (Fig. R-21.B). Además, los niveles aumentaron tras el tratamiento sólo en la fracción citosólica en todos los genotipos (wt, p38 γ ^{-/-} y p38 δ ^{-/-}), indicando que no hay translocación de NF- κ B al núcleo (Fig. R-21.B).

2.2.3. β -catenina/GSK3.

Cuando examinamos los niveles de expresión de β -catenina en extractos totales de colon (Fig. R-22.A), observamos que en todos los genotipos los niveles disminuyen a lo largo del tratamiento, pero en el caso de los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, este descenso es más rápido que en el resto de genotipos (Fig. R-22.A). Este resultado coincide con el encontrado al analizar el estado de fosforilación de GSK3, en el que se observó una bajada de la fosforilación a lo largo del tiempo en todos los genotipos (Fig. R-22.A). Estos resultados sugieren que a tiempos largos de tratamiento, β -catenina está regulada por la fosforilación mediada por GSK3.

A continuación, realizamos el mismo tipo de análisis en las fracciones citosólicas y nucleares de células epiteliales aisladas de ratones control y tratados con DSS durante 4 días (Fig. R-22.B, R-22.C). Al estudiar β -catenina, vimos que tras el tratamiento, había un aumento de sus niveles en todos los genotipos excepto en los p38 γ ^{-/-} (Fig. R-22.B). Además, los niveles de β -catenina son similares en la fracción citosólica y nuclear en los ratones wt, p38 γ ^{-/-} y p38 δ ^{-/-}. Por el contrario, en los ratones p38 γ/δ ^{-/-} los niveles de β -catenina en núcleo son visiblemente mayores que en el citósol (Fig. R-22.B). Esta diferencia es más evidente en las células de los ratones tratados. En cuanto a GSK3, su fosforilación aumentó tras el tratamiento en todos los genotipos (Fig. R-22.C). En el caso de los ratones wt, p38 γ ^{-/-} y p38 δ ^{-/-} los niveles de GSK3 total y fosforilada fueron similares en citósol y núcleo. Sin embargo, en los ratones p38 γ/δ ^{-/-} tratados, los niveles de GSK3 total y fosforilada aumentaron visiblemente en la fracción nuclear (Fig. R-22.C).

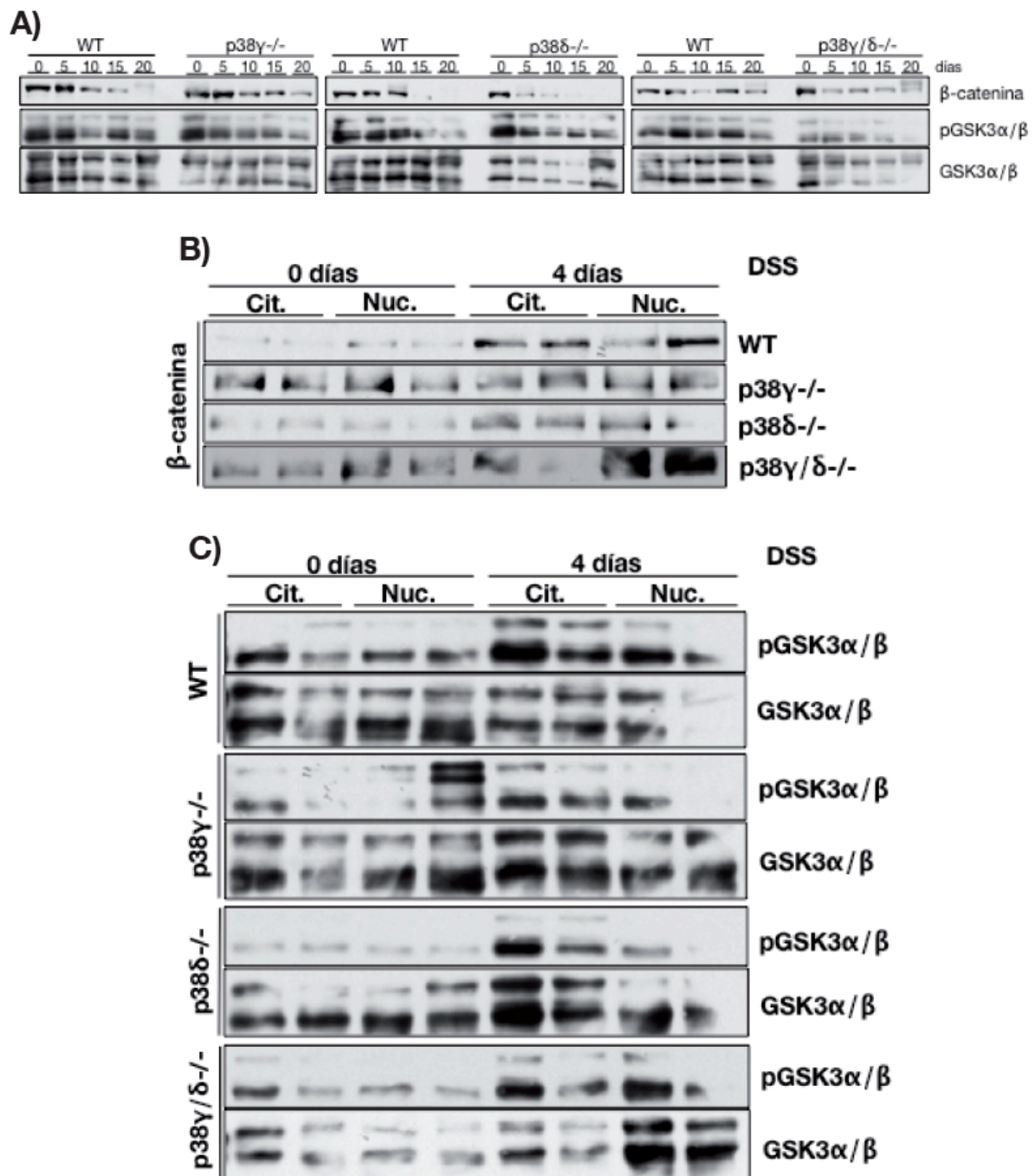


Fig. R-22. Análisis de la vía del señalización de β -catenina en el colon de animales tratados con DSS. **A)** WBs de los niveles de proteína β -catenina y GSK3 α/β , así como del estado de activación de GSK3 α/β , en extractos totales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. **B)** Niveles de proteína β -catenina analizados en fracciones celulares (citósol y núcleo) de células epiteliales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados con DSS durante 0 ó 4 días. Se muestra cada condición analizada por duplicado. **C)** Estado de activación y niveles de proteína GSK3 α/β estudiados en fracciones celulares (citósol y núcleo) de células epiteliales de colon, de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados durante 0 ó 4 días con DSS. Se muestra cada condición analizada por duplicado.

2.3. Moléculas mediadoras en la inflamación intestinal.

2.3.1. STAT3.

También valoramos el estado de fosforilación, así como los niveles de STAT3, en animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} sometidos a tratamiento con DSS. En los

animales wt, p38 γ ^{-/-} y p38 γ /δ^{-/-} observamos un incremento en la fosforilación de STAT3 a los 5 días del tratamiento con DSS, aunque disminuye en días posteriores (Fig. R-23.A). En el caso de los ratones p38δ^{-/-} este incremento en la fosforilación de STAT3 no se produce. Los niveles totales de STAT3 son similares en todos los genotipos y no varían a lo largo del tratamiento (Fig. R-23.A).

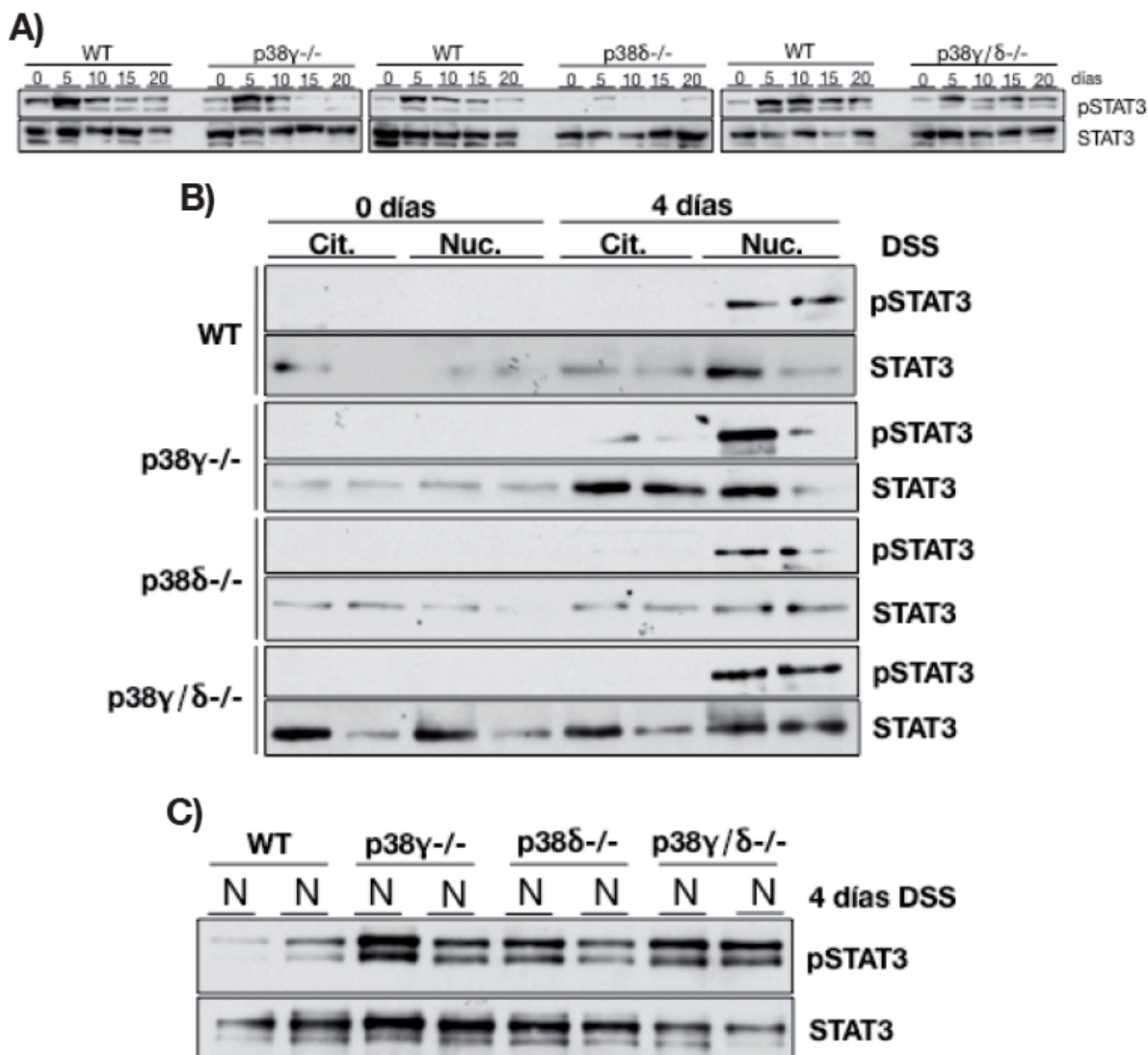


Fig. R-23. Análisis del estado de fosforilación y de los niveles de proteína STAT3 en el colon de ratones tratados con DSS. A) Estado de fosforilación y niveles de proteína STAT3 en extractos totales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38 γ /δ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. **B)** Estado de fosforilación y niveles de proteína STAT3 analizados en fracciones celulares (citósol y núcleo) de células epiteliales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38 γ /δ^{-/-} tratados durante 0 ó 4 días con DSS. Se muestra cada condición analizada por duplicado. **C)** Niveles de proteína y estado de fosforilación de STAT3 en la fracción nuclear de células epiteliales de colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38 γ /δ^{-/-} tratados con DSS durante 4 días. Se muestra cada condición analizada por duplicado.

Además, también analizamos la fosforilación y los niveles de STAT3 en fracciones de células del epitelio intestinal (citósol y núcleo) de ratones que fueron tratados o no con DSS. Observamos que tras el tratamiento, los niveles totales de STAT3 aumentan en las células wt y p38 γ ^{-/-} independientemente de la fracción subcelular estudiada, mientras que en las células p38δ^{-/-} y p38 γ /δ^{-/-} los niveles no se ven afectados por el tratamiento con DSS (Fig. R-23.B). Además, la fosforilación de STAT3 aumentó tras el tratamiento sólo en la fracción nuclear en todos los genotipos (Fig. R-23.B) y este aumento fue mayor en las células p38 γ ^{-/-}, p38δ^{-/-} y

p38 γ /δ^{-/-} (Fig. R-23.C). Los niveles totales de STAT3 en el núcleo de estas células son similares en todos ratones tratados con DSS.

2.3.2. COX2.

Valoramos los niveles de COX2 en el modelo de colitis ulcerosa, al igual que hicimos en el modelo de CAC. Para ello estudiamos los niveles de mRNA (Fig. R-24), ya que los niveles de proteína COX2 no pudieron ser detectados por WB a partir de extractos totales de colon (dato no mostrado). Aunque la variabilidad de los datos es muy grande, tras el tratamiento encontramos un aumento en los niveles de mRNA en todos los genotipos (Fig. R-24). Este aumento se mantiene por encima del basal hasta los 20 días. Además, los niveles de mRNA de COX2 que se alcanzan en los ratones p38δ^{-/-} y p38γ/δ^{-/-} son inferiores a los de los ratones wt y p38γ^{-/-}. En el caso de los ratones p38g^{-/-}, los niveles de COX2 son mayores a los de wt a tiempos 0 y 10 días de tratamiento (Fig. R-24). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el modelo de CAC, en los que los niveles de mRNA de COX2 aumentaban tras el tratamiento (AOM/DSS) en los ratones wt y p38γ^{-/-} (Fig. R-10.A).

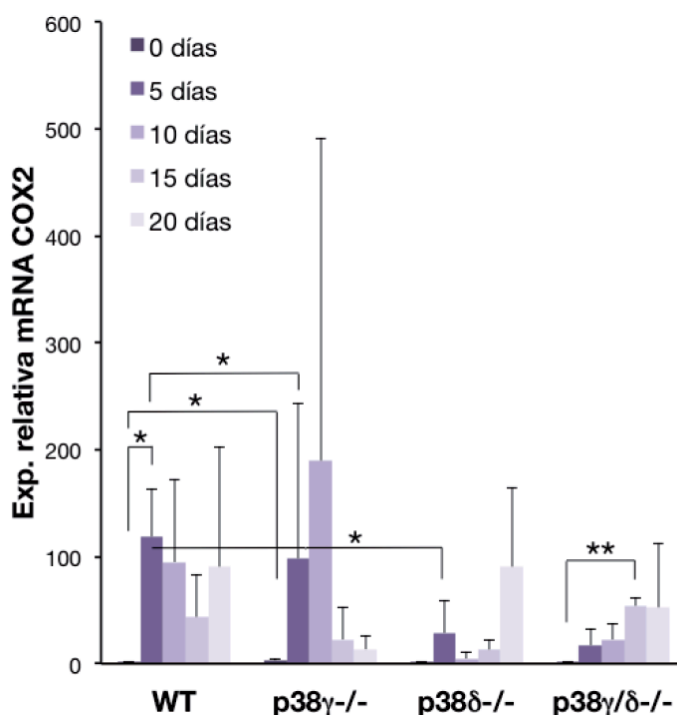


Fig. R-24. Expresión de mRNA de COX2 en ratones wt, p38γ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38γ/δ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. Se analizaron los niveles de mRNA de COX2 en animales wt (n_{total}=15), p38γ^{-/-} (n_{total}=15), p38δ^{-/-} (n_{total}=15) y p38γ/δ^{-/-} (n_{total}=15) en la diferentes condiciones experimentales. *p<0,05; **p<0,01.

2.3.3. MMP9.

Con la metaloproteinasas MMP9 se hizo un abordaje semejante al realizado con la proteína COX2 (Fig. R-24). Los niveles de mRNA de MMP9 aumentaron significativamente en todos los genotipos a los 5 días del tratamiento con DSS y bajaron en días posteriores. Salvo en el caso de los ratones p38γ^{-/-}, en los que los niveles de MMP9 se mantuvieron iguales a lo largo de los días 5 y 10 del tratamiento (Fig. R-25). El aumento de MMP9 fue mayor en los animales wt que en

el resto de los genotipos, y este incremento fué estadísticamente significativo con respecto a los ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\delta^{-/-}$ (Fig. R-25). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el modelo de CAC, en los que los niveles de mRNA de MMP9 alcanzaban niveles mayores tras el tratamiento (AOM/DSS) en los ratones wt (Fig. R-11.A).

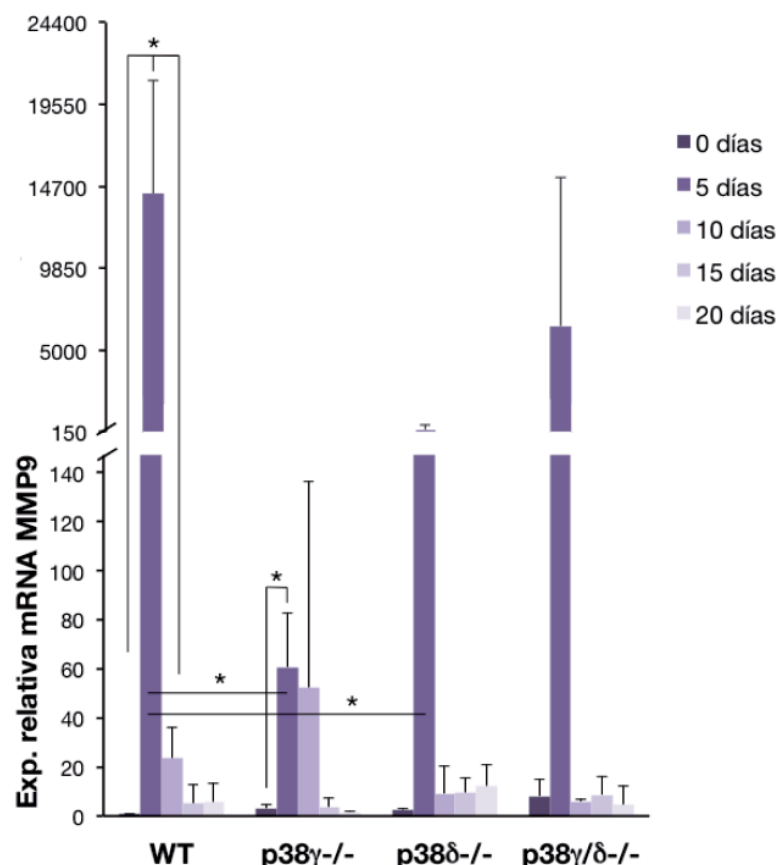


Fig. R-25. Expresión de mRNA de MMP9 en ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. Se analizaron los niveles de mRNA de MMP9 en animales wt ($n_{total}=30$), $p38\gamma^{-/-}$ ($n_{total}=15$), $p38\delta^{-/-}$ ($n_{total}=15$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{total}=29$) en la diferentes condiciones experimentales. * $p<0,05$.

2.3.4. Niveles de citoquinas.

Como ya mencionamos en el apartado 2.1.2. de la Introducción, en la patogénesis de la inflamación intestinal del colon van a jugar un papel muy importante moléculas efectoras como son las citoquinas. Por lo que analizamos los niveles de expresión de mRNA de varias citoquinas (IL1 β , IL6, IL10 y TNF α), tras el tratamiento con DSS y posteriores tiempos de recuperación, en los diferentes genotipos, así como sus niveles de proteína producida y secretada (Fig. R-26).

En los cuatro genotipos, se observó que la producción del mRNA de todas las citoquinas aumentaba tras los 5 días de tratamiento con DSS y que descendía en los días posteriores (Fig. R-26.A). Aunque existe una gran variabilidad entre los datos obtenidos a los 5 días del tratamiento, en el caso de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, el incremento fue mayor en los ratones wt que en los animales $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-26.A). Por otro lado, los niveles de mRNAs de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 β e IL6 parecen ser mayores en los ratones $p38\gamma^{-/-}$ (Fig. R-26.A), mientras que los de TNF α son mayores en los ratones $p38\delta^{-/-}$ a los 5 días de tratamiento con DSS (Fig. R-26.A). Por el contrario, en tiempos posteriores del ensayo (días 10, 15 y 20) no observamos diferencias en los niveles de

expresión de mRNA de ninguna de las citoquinas estudiadas al compararlas entre los diferentes genotipos.

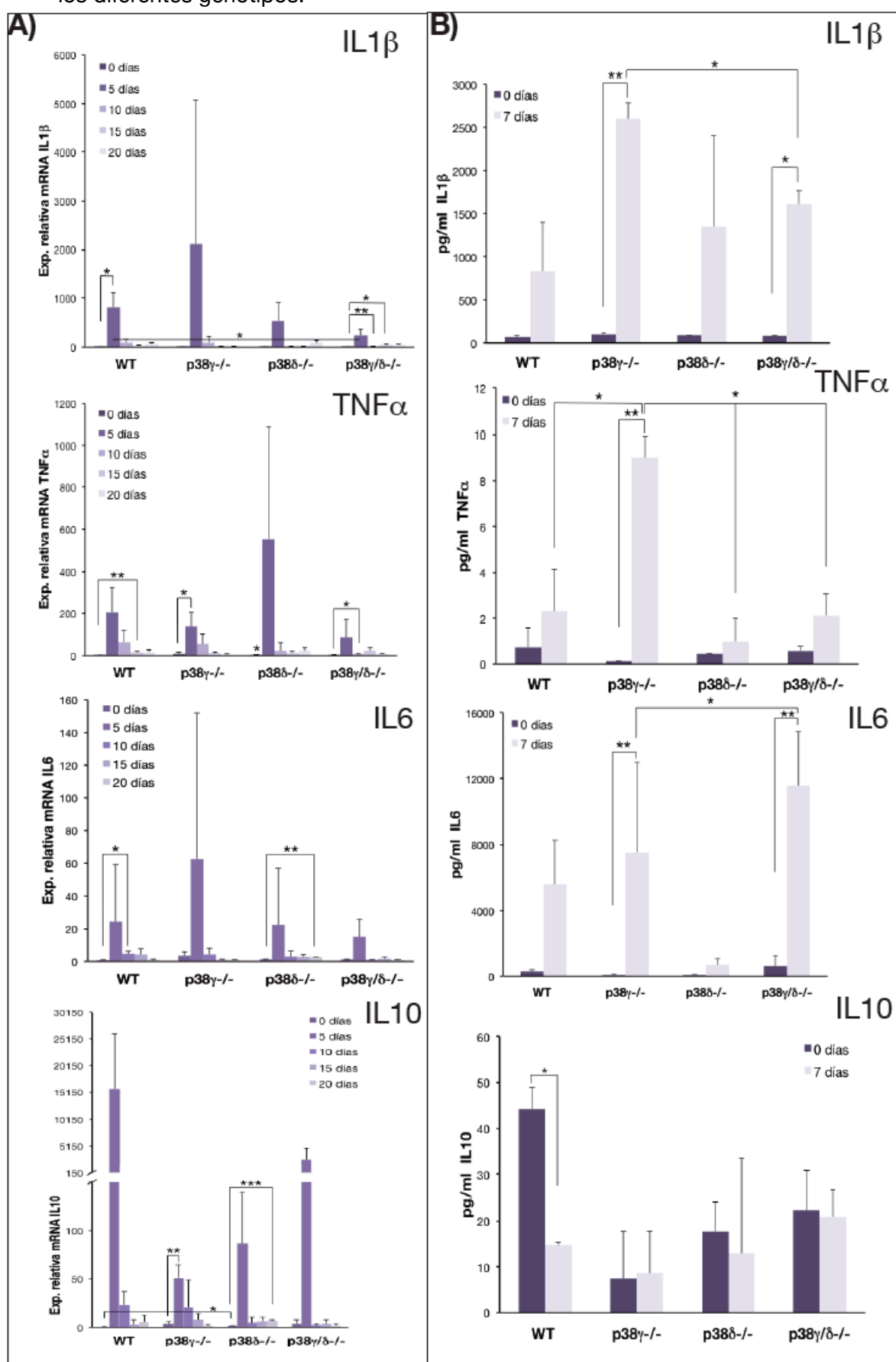


Fig. R-26. Niveles de expresión de mRNA y niveles de secreción de citoquinas en ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tras el tratamiento con DSS. A) Representaciones gráficas de los niveles de mRNA de citoquinas anti- (IL10) y pro-inflamatorias (IL1 β , TNF α , IL6) medidas en el colon de animales wt (n_{total}=15), p38 γ ^{-/-} (n_{total}=15), p38 δ ^{-/-} (n_{total}=15) y p38 γ/δ ^{-/-} (n_{total}=15) a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. **B)** Representaciones gráficas de los niveles de citoquinas anti- (IL10) y pro-inflamatorias producidas y secretadas (IL1 β , TNF α , IL6) en el colon de animales wt (n_{total}=12), p38 γ ^{-/-} (n_{total}=12), p38 δ ^{-/-} (n_{total}=12) y p38 γ/δ ^{-/-} (n_{total}=11) a los 0 y 7 días del inicio del tratamiento con DSS.

Además, también medimos los niveles de proteína de las distintas citoquinas pro- y anti-inflamatorias producidas y secretadas en el colon como se describe en el apartado 10 de Materiales y métodos. Todas las citoquinas pro-inflamatorias (IL1 β , IL6 y TNF α) aumentaron su grado de secreción tras el tratamiento con DSS en todos los ratones (Fig. R-26.B). En el caso de la IL1 β y TNF α , su producción fue mayor en los ratones p38 γ ^{-/-} que en el resto de genotipos (Fig. R-26.B). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la producción de la IL1 β , entre los ratones p38 γ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}, tras el tratamiento. Así como en el caso de la citoquina TNF α , al comparar sus niveles entre los animales p38 γ ^{-/-} y el resto de genotipos, tras el tratamiento (Fig. R-26.B). Sin embargo, la producción de IL6 presentó niveles semejantes en todos genotipos (Fig. R-26.B). Por otro lado, la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL10, no aumentó con el tratamiento en ninguno de los genotipos. En el caso de los ratones wt disminuyó significativamente tras el tratamiento (Fig. R-26.B). Además, los niveles basales de IL10 en los ratones wt fueron mayores que en los ratones deficientes en p38 γ , p38 δ y p38 γ/δ (Fig. R-26.B).

Estos resultados sugieren que la falta de p38 γ parece promover la síntesis de moléculas efectoras (IL1 β y TNF α) que en el colon favorecen los procesos inflamatorios.

2.4. Células implicadas en la inflamación.

Macrófagos, neutrófilos y linfocitos, desempeñan un papel muy importante en los procesos inflamatorios, por lo que evaluamos su grado de infiltración en el colon mediante tinciones de inmunofluorescencia de secciones y su posterior cuantificación.

2.4.1. Macrófagos.

Se llevó a cabo el análisis de la infiltración de macrófagos en el colon de animales wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} tratados con DSS como se describe en la figura M-1. El estudio se realizó en secciones teñidas con el marcador de superficie específico de macrófagos (F4/80) y se cuantificaron las células F4/80⁺. En la figura R-27.A se muestran secciones representativas sobre las que se realizó la cuantificación de células F4/80⁺ en los diferentes genotipos y tiempos del experimento.

Tras la cuantificación (Fig. R-27.B), observamos una clara diferencia entre los ratones wt y los p38 γ ^{-/-} con respecto a los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} (Fig. R-27.B). Los animales wt y los carentes en p38 γ , tras el tratamiento, tuvieron un comportamiento muy semejante en la infiltración de macrófagos, presentando un aumento a los 5 días y un descenso a los 10 días del tratamiento (Fig. R-27.B). En ambos casos, las diferencias entre el grado de infiltración basal y el grado de infiltración a los día 5 fueron estadísticamente significativas. Por otro lado, tras los 5 días de tratamiento, observamos que la infiltración de macrófagos en los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} fue mucho más baja que la de los wt y p38 γ ^{-/-} (Fig. R-27.B). En

ambos genotipos, encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales wt. Sin embargo, tras el tiempo de recuperación (a los 10 días de tratamiento), en los animales $p38\delta^{-/-}$ observamos un aumento en su grado de infiltración, llegando a niveles similares a los encontrados en wt y $p38\gamma^{-/-}$ (Fig. R-27.B). Mientras que en los ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ el grado de infiltración disminuye a los 10 días, con respecto al día 5, y este descenso es significativamente menor que el observado en los ratones wt a día 10.

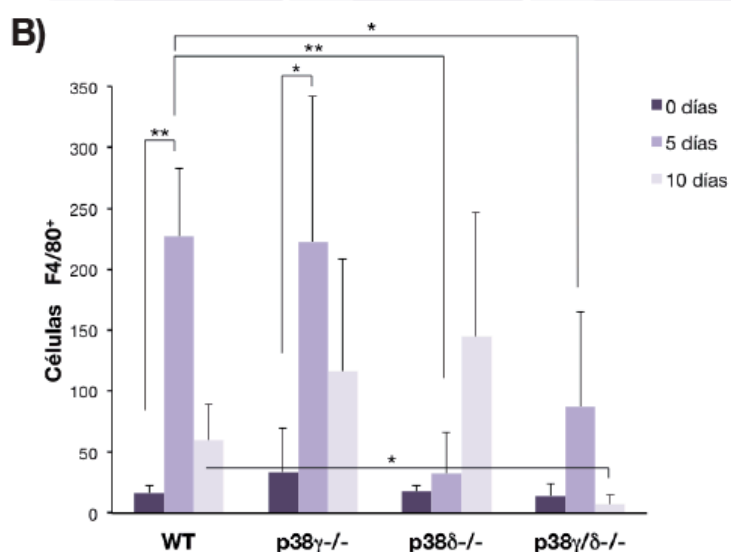
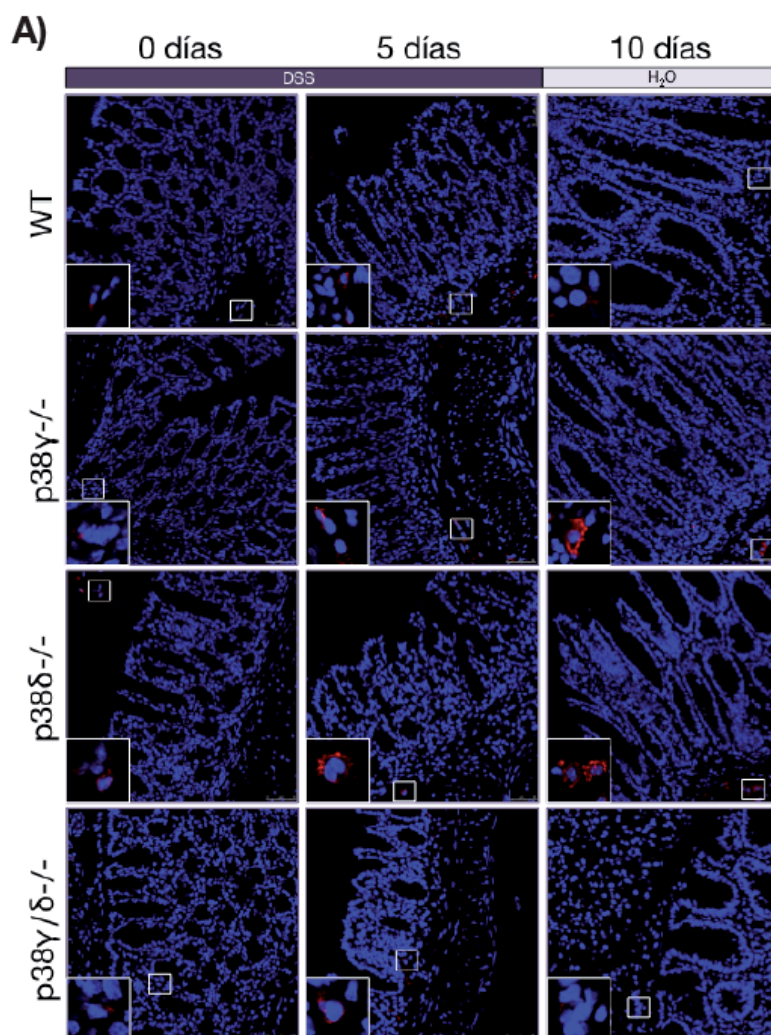


Fig. R-27. Infiltración de macrófagos en el colon de animales tratados con DSS. A) Secciones del colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5 y 10 días del inicio del tratamiento con DSS. Estas secciones están teñidas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-F4/80 (rojo) y con un tinte específico de núcleo como es el Hoechst (azul). **B)** Cuantificación de células F4/80⁺, sobre secciones histológicas de ratones wt (n_{total}=12), p38 γ ^{-/-} (n_{total}=12), p38 δ ^{-/-} (n_{total}=12) y p38 γ/δ ^{-/-} (n_{total}=12), en nuestras condiciones experimentales. Por cada ratón analizado se cuantificaron 15 campos. *p<0,05; **p<0,01.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la isoforma p38 δ es la principal responsable de los bajos niveles de infiltración de macrófagos, tras el tratamiento con DSS.

2.4.2. Neutrófilos.

En el análisis de la infiltración de neutrófilos se realizó un abordaje similar al utilizado para el estudio de los macrófagos, pero la detección se hizo utilizando el marcador de superficie (Gr1).

En la figura R-28.A se muestran secciones representativas sobre las que se realizó la cuantificación de células Gr1⁺ en los diferentes genotipos y tiempos del ensayo. Tras la cuantificación volvemos a observar una clara diferencia entre los ratones wt y p38 γ ^{-/-} con respecto a los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} (Fig. R-28.B). Los animales wt y los p38 γ ^{-/-}, tras el tratamiento, tuvieron un aumento en la infiltración de neutrófilos muy semejante, a los días 5 y 10. Por otro lado, la infiltración de neutrófilos en los ratones p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} fue mucho más baja que la de los wt y p38 γ ^{-/-}, tras los 5 y 10 días de tratamiento. En ambos casos encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales wt, tras 5 días de tratamiento (Fig. R-28.B).

Por lo tanto, nuestros resultados vuelven a sugerir la isoforma p38 δ es la principal responsable en la bajada de la infiltración de neutrófilos, tras el tratamiento con DSS.

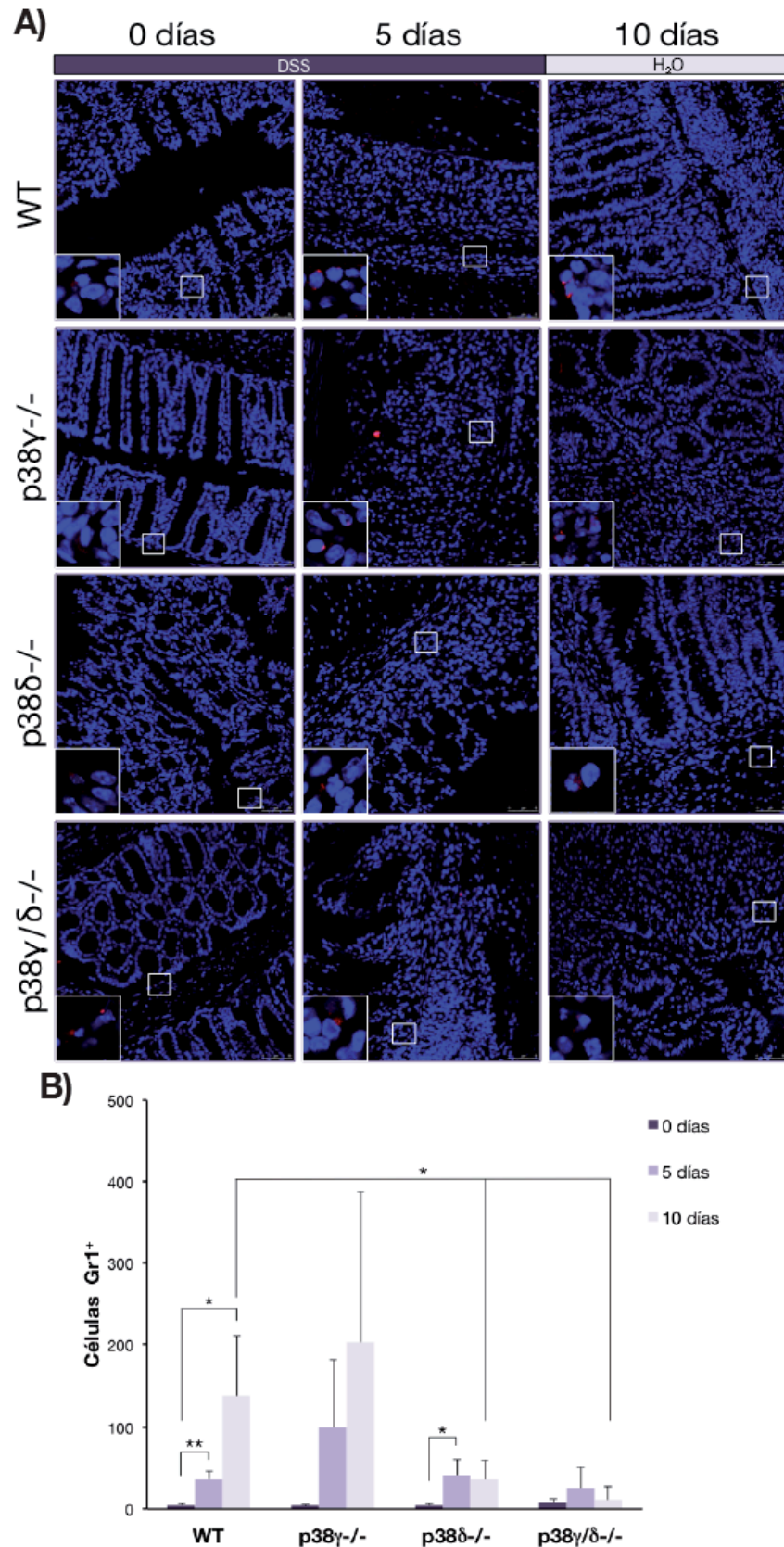


Fig. R-28. Infiltración de neutrófilos en el colon de animales tratados con DSS. **A)** Secciones del colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5 y 10 días del inicio del tratamiento con DSS. Estas secciones están teñidas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Gr1 (rojo) y con un tinte específico de núcleo como es el Hoechst (azul). **B)** Cuantificación de células Gr1⁺, sobre secciones histológicas de ratones wt ($n_{\text{total}}=12$), p38 γ ^{-/-} ($n_{\text{total}}=12$), p38 δ ^{-/-} ($n_{\text{total}}=12$) y p38 γ/δ ^{-/-} ($n_{\text{total}}=12$), en nuestras condiciones experimentales. Por cada ratón analizado se cuantificaron 15 campos. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

2.4.3. Linfocitos.

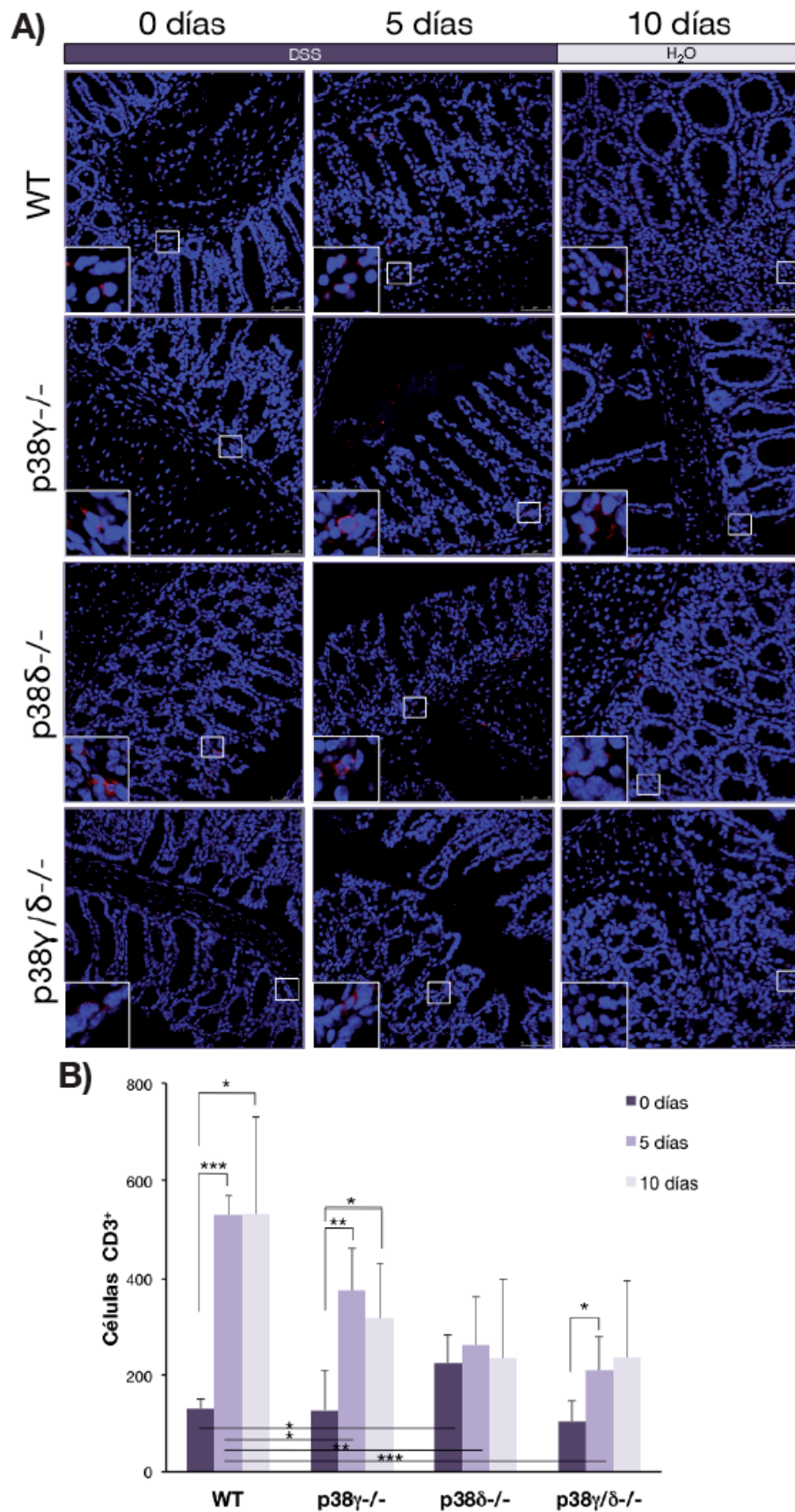


Fig. R-29. Infiltración de linfocitos en el colon de animales tratados con DSS. A) Secciones del colon de ratones wt, p38γ^{-/-}, p38δ^{-/-} y p38γ/δ^{-/-} a los 0, 5 y 10 días del inicio del tratamiento con DSS.

Estas secciones están teñidas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD3 (rojo) y con un tinte específico de núcleo como es el Hoechst (azul). **B)** Cuantificación de células CD3⁺, sobre secciones histológicas de ratones wt ($n_{\text{total}}=12$), p38 $\gamma^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$), p38 $\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$) y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ ($n_{\text{total}}=12$), en nuestras condiciones experimentales. Por cada ratón analizado se cuantificaron 15 campos. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

El estudio de la infiltración de los linfocitos se realizó con un marcador específico frente al receptor de superficie CD3, mediante histoinmunofluorescencia en secciones de colon. A continuación, realizamos el conteo de las células CD3⁺ como ya hemos descrito para los tipos celulares anteriores.

En la figura R-29.A se muestran secciones representativas sobre las que se realizó la cuantificación de células CD3⁺ en las diferentes condiciones experimentales. Tras la cuantificación observamos que en condiciones basales, los ratones deficientes en p38 δ presentaban casi el doble de linfocitos que el resto de los genotipos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a los ratones wt (Fig. R-26.B).

Tras el tratamiento, todos los genotipos, excepto p38 $\delta^{-/-}$, presentaron un aumento en la infiltración de linfocitos, que fue estadísticamente significativo, respecto a sus correspondientes basales (Fig. R-29.B). Este aumento fue significativamente mayor en los ratones wt con respecto a los ratones p38 $\gamma^{-/-}$, p38 $\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-29.B). Por otro lado, la infiltración de células CD3⁺ encontrada en las secciones de colon de los ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ fue 2 veces menor que la observada en los ratones wt.

Nuestros resultados indican que la carencia de p38 γ y p38 δ disminuye la infiltración de linfocitos tras el tratamiento con DSS.

DISCUSIÓN

En esta tesis se describe por primera vez la participación de las isoformas p38 γ y p38 δ MAPKs en los procesos de inflamación y transformación celular, que se dan en el desarrollo tumoral en el modelo de CAC, así como los procesos inflamatorios que se dan en el modelo de CU. Nuestros resultados muestran que, aunque ambas isoformas participan tanto en la inflamación como en el desarrollo tumoral, parece que la proteína p38 γ tiene un papel predominante en la regulación de procesos inflamatorios, mientras que la proteína p38 δ es la principal isoforma responsable del desarrollo tumoral.

Evidencias de que la isoforma p38 γ participa en los procesos inflamatorios en los modelos de CU y CAC en ratones.

La CU presenta, en humanos y en ratones, una sintomatología caracterizada por un descenso tanto del peso como del acortamiento en la longitud del colon de los individuos que la desarrollan (Danese & Fiocchi, 2011; Suzuki *et al.*, 2006).

Mientras esta tesis se estaba realizando, el grupo del Dr. J. Han describió que el peso de los animales deficientes en p38 γ y deficientes en p38 δ descendía con el tratamiento con DSS (Otsuka *et al.*, 2010). Sin embargo, como este descenso era similar al experimentado por los animales wt, usados como control, concluyeron que las isoformas p38 γ o p38 δ no estaban implicadas en los procesos inflamatorios asociados a la administración de DSS en el modelo de CU y no realizaron análisis posteriores de estos ratones (Otsuka *et al.*, 2010). Nuestros resultados también muestran esta bajada inicial, tanto del peso (Fig. R-16.A) como de la longitud del colon (Fig. R-16.B), tras el tratamiento con DSS y su posterior recuperación hasta valores basales, independientemente del genotipo y, como se ha descrito anteriormente, para ratones con fondo genético C57BL/6 (Yan *et al.*, 2009). Por el contrario, en los animales p38 γ ^{-/-}, tras el tratamiento con AOM/DSS, si se observa un descenso más acusado tanto en la variación de peso (Fig. R-1.B) como en el acortamiento de la longitud del colon (Fig. R-1.C), así como un menor porcentaje de supervivencia (Fig. R-1.A), en comparación con el resto de genotipos. Lo que sugiere una implicación de la isoforma p38 γ en procesos relacionados con el mantenimiento de la funcionalidad de la mucosa intestinal.

Otros parámetros que se ven afectados tras el tratamiento con DSS son el grado de daño en el epitelio intestinal, el grado de inflamación de la mucosa intestinal o el desarrollo de una mucosa displásica como efecto del tratamiento (Suzuki *et al.*, 2006). Estos parámetros se han analizado en animales deficientes en p38 α , de modo específico, en las células epiteliales del colon (Kang *et al.*, 2010; Otsuka *et al.*, 2010). Al someter a estos animales a una infección con *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) se observó un descenso en la susceptibilidad de la mucosa frente a la infección (Kang *et al.*, 2010). Por el contrario, al someter a los animales a tratamiento con DSS, se observó un incremento tanto del grado de inflamación como del grado de daño epitelial (Otsuka *et al.*, 2010), poniendo de manifiesto la ambigüedad de la respuesta en función del tratamiento administrado. Al someter a nuestros animales a tratamiento con DSS observamos que los ratones p38 γ ^{-/-} presentan un mayor grado de daño epitelial (Fig. R-17.B), con la aparición de úlceras activas (Fig. R-18.A), una mayor inflamación de la mucosa intestinal (Fig. R-17.C), así como un mayor grado de displasia en dicha mucosa (Fig. R-17.A), que el resto de genotipos. Por tanto, aunque estos animales no presentaron una bajada de peso y un acortamiento del colon significativamente distinto al de los animales wt, si presentaron un perfil histopatológico mucho más marcado que el resto de genotipos, por lo que la isoforma p38 γ parece desempeñar un importante papel en los procesos inflamatorios vinculados a la CU.

Por otro lado, también analizamos por primera vez el fenotipo histopatológico de los animales tras el tratamiento con AOM/DSS (Fig. R-2; R-3). Los ratones $p38\gamma^{-/-}$ presentaron tumores en la mucosa intestinal en un número similar al encontrado en los animales wt (Fig. R-2.B) y semejante al ya descrito para ratones con fondo genético C57BL/6 (Suzuki *et al.*, 2006). Por el contrario, las lesiones ulcerosas encontradas en ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ fueron más numerosas y de mayor tamaño que las encontradas en los ratones wt (Fig. R-3.B; R-3.D). Sorprendentemente, los animales $p38\delta^{-/-}$ no presentaron úlceras (Fig. R-3.B). Estos resultados sugieren el importante papel que debe desempeñar $p38\gamma$ en la regulación de los procesos inflamatorios que se dan en el CAC, así como su posible implicación en procesos de cierre de herida, que ayuden a regenerar el epitelio dañado tras la ingesta de DSS. En este proceso de regeneración del epitelio va a ser muy importante la regulación de procesos como la proliferación celular, para sustituir las células que se han perdido por el daño epitelial, así como la apoptosis celular, que se da en las células epiteliales dañadas y como consecuencia, la pérdida de la continuidad del epitelio intestinal y la consecuente pérdida de la homeostasis del tejido (Sturm & Dignass, 2008). Se ha descrito que los animales carentes en $p38\alpha$ en células epiteliales de la mucosa intestinal, presentaban un grado de apoptosis semejante al de los animales wt, tras la infección con *C. rodentium* (Kang *et al.*, 2010). Por el contrario, al someterlos a tratamiento con DSS se observó una mayor pérdida de células caliciformes y un aumento en la proliferación celular (Otsuka *et al.*, 2010), volviendo a presentar una respuesta ambivalente en función del modelo utilizado. En nuestros análisis, los animales $p38\gamma^{-/-}$ tratados con AOM/DSS presentan un grado de proliferación semejante al de los animales wt (Fig. R-4.B). Por el contrario, tras el tratamiento con DSS, hay un mayor aumento de la apoptosis en las células epiteliales del colon en ratones $p38\gamma^{-/-}$ que en animales wt (Fig. R-5.B) y este incremento es incluso mayor en los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-5.B). Lo que nos sugiere que ambas isoformas, $p38\gamma$ y $p38\delta$, participan en la regulación del proceso de apoptosis que se da en la CU pero, la $p38\gamma$ sería la principal responsable. Se ha descrito que la proteína $p38\gamma$ participa en el control de la estabilidad cromosómica y mantiene la viabilidad celular (Kukkonen-Macchi *et al.*, 2011). Se ha observado que en células HeLa carentes en esta proteína se generan “*spindle*” anormales, produciéndose una alineación cromosómica anómala, lo que hace que la célula no pueda continuar con el ciclo celular y se produzca una muerte celular masiva mediada por caspasas. (Kukkonen-Macchi *et al.*, 2011). Dentro de las moléculas implicadas en la apoptosis encontramos a la familia de las caspasas, principales proteínas efectoras de apoptosis. Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos. Cuando estos zimógenos se fragmentan, dan lugar a enzimas activas que inducen apoptosis. Dentro de las caspasas denominadas ejecutoras de apoptosis, la caspasa 3 es considerada crucial en el proceso de ejecución de la apoptosis (Jin & El-Deiry, 2005; Zheng *et al.*, 2000). Observamos que los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$, en las células epiteliales del colon y tras el tratamiento con DSS, apenas presentaban caspasa 3 inactiva (Fig. R-5.C), lo que podría explicar sus elevados niveles de apoptosis a tiempo 0 de tratamiento (Fig. R-5.C), relacionando la regulación de actividad de caspasa 3 con ambas isoformas.

En todos los procesos inflamatorios, entre ellos la CU, se producen una serie de moléculas, efectoras o mediadoras de la inflamación, como son las citoquinas o las quimioquinas, así como el reclutamiento de células del sistema inmune, como macrófagos o neutrófilos. Dentro de las citoquinas, tanto la $IL1\beta$ como el $TNF\alpha$ son proteínas pro-inflamatorias que estimulan la producción de otras citoquinas o proteasas por parte de macrófagos, neutrófilos o células epiteliales del intestino, amplificando la respuesta inmune. Al mismo tiempo, ambas proteínas van a ser importantes mediadores de la migración de células efectoras del sistema inmune hacia la zona de inflamación, estimulando la producción de quimioquinas. Se ha descrito que la $IL1\beta$ parece ser la

primera molécula implicada en la aparición de diarrea, principal síntoma de la inflamación intestinal. Elevados niveles tanto de IL1 β como de TNF α producen muerte celular, edema, infiltración de neutrófilos, pérdida de células caliciformes, así como aparición de úlceras en la mucosa (Sartor, 1994). Otra citoquina, que puede ser producida por macrófagos activados localizados en la lámina propia del intestino o por células epiteliales, es la IL6. La producción de esta citoquina está incrementada en la mucosa intestinal inflamada (Maloy & Powrie, 2011). Por otro lado, hay una serie de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL10, que son necesarias para regular y modular la respuesta inmune. Se ha descrito que ratones deficientes en IL10 desarrollan colitis. Por lo que, la IL10 parece controlar la cronicidad de la inflamación intestinal, mediante su acción anti-inflamatoria (Maloy & Powrie, 2011). Se ha descrito que los niveles de mRNA de estas citoquinas (IL1 β , TNF α , IL6 e IL10) son máximos en animales C57BL/6 tras 5 días de tratamiento con DSS (Yan *et al.*, 2009). Al analizar el patrón de expresión de estas citoquinas tras el tratamiento con DSS en nuestros ratones, observamos que los animales wt presentaban el mismo perfil de expresión al ya descrito, tanto a nivel de mRNA (Fig. R-26.A) como a nivel de proteína secretada (Fig. R-26.B). Por el contrario, cuando analizamos el perfil de citoquinas secretadas en los animales p38 $\gamma^{-/-}$ observamos diferencias con respecto al de los ratones wt (Fig. R-26.B), detectándose unos niveles de IL1 β , IL6 y TNF α por encima de los de los de wt y unos niveles de IL10 mucho más bajos (Fig. R-26.B). Estos resultados sugieren un control de la secreción de citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias por parte de la isoforma p38 γ . Esta regulación podría ser a nivel post-transcripcional en el caso de la citoquina TNF α , ya que los niveles de mRNA son semejantes a los encontrados en wt (Fig. R-26.A) pero por el contrario, los niveles secretados son mucho mayores que los de wt (Fig. R-26.B). Recientemente, hemos descrito en nuestro grupo que p38 γ y p38 δ participan en la regulación de la maduración y secreción de TNF α en macrófagos (Risco *et al.*, 2012).

Como ya hemos mencionado previamente, otra consecuencia de la inflamación intestinal en la CU, es el reclutamiento de células del sistema inmune. Se ha descrito que en animales donde selectivamente se ha delecionado p38 α en las células del epitelio intestinal y tras haberlos sometido a infección con *C. rodentium*, no presentaban diferencias en la infiltración de células CD11c $^{+}$ ni de células Gr1 $^{+}$, por el contrario si presentaron un descenso en la infiltración de células CD4 $^{+}$ (Kang *et al.*, 2010). Por tanto, en este modelo de inflamación intestinal p38 α no participaría en la movilización y migración ni de macrófagos (CD11c $^{+}$) ni de neutrófilos (Gr1 $^{+}$). Nosotros, en el modelo de CU, mediante administración de DSS, observamos que los animales p38 $\gamma^{-/-}$ presentan una infiltración de macrófagos más sostenida (Fig. R-27.B), así como una mayor infiltración de neutrófilos (Fig. R-28.B) al compararlos con los animales wt, lo que nos sugiere la participación de esta isoforma en la movilización e infiltración en la zona de daño de ambos tipos celulares. En nuestro grupo se ha descrito previamente que células MEF (*Mouse embryonic fibroblast*) carentes en p38 γ presentaban una mayor migración en comparación con células wt (Cerezo-Guisado *et al.*, 2011). Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la falta de p38 γ contribuiría a un aumento de la migración de células inmunes que potencian y exacerban la inflamación de la mucosa intestinal, aumentando la producción y secreción de citoquina pro-inflamatorias (Fig. R-26.B), que a su vez contribuirían a generar un mayor daño epitelial (Fig. R-17.B) y a un aumento de la inflamación de la mucosa (Fig. R-17.C).

Por otro lado, en el CAC una de las moléculas que se ve incrementada es la proteína inflamatoria COX2, que participa en la producción de mediadores inflamatorios, como las prostaglandinas (Eisinger *et al.*, 2007). En la mayoría de los tejidos normales, COX2 no es detectable, pero es rápidamente inducida en respuesta a citoquinas (IL1 β , TNF α), lo que

hace que se acumulen prostaglandinas en los tejidos neoplásicos e inflamados. (Wang & Dubois, 2010). Sorprendentemente, los niveles más altos tanto de mRNA (Fig. R-10.A) como de proteína COX2 (Fig. R-10.C; R-10.D) los observamos en los ratones carentes en p38 γ , tratados con AOM/DSS, aunque estos animales no han sido los que mayor número o tamaño de tumores presentaban (Fig. R-2.B; R-2.D). La relación entre los niveles de COX2 y la aparición de tumores se ha establecido al realizar estudios epidemiológicos, ensayos clínicos y modelos experimentales mediante el uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas, que ejercen un efecto anti-inflamatorio y anti-tumoral principalmente por la reducción de los niveles de prostaglandinas, mediante la inhibición de la actividad de COX2 (Wang & Dubois, 2010). Recientemente se ha descrito que la aparición de tumores en el modelo de CAC no requiere la expresión de COX2 (Ishikawa & Herschman, 2010). Usando animales carentes en COX2 y tratándolos con AOM/DSS, se observó que aparecían tumores tras el tratamiento (Ishikawa & Herschman, 2010). Por lo que los altos niveles de COX2 observados en los animales p38 γ ^{-/-} podrían deberse a la regulación que ejerce p38 γ sobre los niveles de esta proteína (mRNA (Fig. R-10.A) y proteína expresada en el tejido (Fig. R-10.C; R-10.D)). Al regular p38 γ la expresión de COX2 en estas condiciones, estaría mediando en procesos inflamatorios y no tumorales. La expresión de COX2 está regulada a nivel transcripcional, por factores de transcripción como AP-1 (Wang & Dubois, 2010). Las p38MAPKs son unas de las principales MAPKs implicadas en el reclutamiento de este factor de transcripción (Kyriakis & Avruch, 2012), por lo que p38 γ podría estar regulando los niveles de COX2 vía AP-1. Por otro lado, la proteína COX2 también está regulada a nivel post-transcripcional, mediante la estabilización de su mRNA (Wang & Dubois, 2010). Se ha descrito que las p38MAPKs también participan en la estabilización de diferentes mRNA de citoquinas pro-inflamatorias como IL6 o TNF α (Kyriakis & Avruch, 2012), por lo que p38 γ también podría regular la producción de COX2 mediante la estabilización de su mRNA.

Por tanto, todos nuestros resultados sugieren que, dentro de las p38MAPKs alternativas, la proteína p38 γ es la principal isoforma implicada en la regulación de los procesos inflamatorios que se dan en los modelos de CU y CAC en ratones.

Evidencias de que la p38 δ participa en el desarrollo tumoral en el modelo de CAC en ratones.

Se ha descrito que en ratones de fondo genético C57BL/6, a los que se les administró AOM/DSS, presentaron una media de unos 8 tumores por ratón (Suzuki et al., 2006). Cuando tratamos nuestros ratones con AOM/DSS (con el mismo fondo genético), los animales wt y p38 γ ^{-/-} presentan unos valores semejantes a los descritos. Sin embargo, observamos un aumento tanto en el número (Fig. R-2.B) como en el tamaño (Fig. R-2.D) de los tumores desarrollados en el colon de animales p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-}. Lo que sugiere que la isoforma p38 δ podría estar regulando procesos que contribuyen al desarrollo tumoral. Además, tras el tratamiento con AOM/DSS, los ratones p38 δ ^{-/-} no presentaron úlceras en la mucosa intestinal (Fig. R-3.B), lo que podría indicar la participación de p38 δ en la regulación de procesos de cierre de herida o de regeneración tisular, ya que en las fases iniciales del CAC, durante la CU, si presentaron úlceras como el resto de genotipos (Fig. R-18.B).

El desarrollo tumoral puede darse por la alteración de un gran número de procesos. Dentro de estos procesos podemos encontrar alteraciones en la proliferación celular, mediante evasión de las señales supresoras de crecimiento celular, por una replicación celular incontrolada o mediante inestabilidad y mutaciones genéticas (Hanahan & Weinberg, 2011). Por otro lado, también va a jugar un papel muy importante en el

desarrollo tumoral las alteraciones que pueden aparecer en el proceso de apoptosis. La desregulación de la apoptosis contribuye a la aparición de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer (Jin & El-Deiry, 2005). Por tanto el equilibrio entre proliferación y apoptosis, entre otros procesos, va a determinar la aparición de tumores. Al analizar la proliferación en nuestros ratones, observamos que los animales $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ presentaban una mayor proliferación celular tras el tratamiento con AOM/DSS (Fig. R-4.B), lo que puede contribuir al mayor desarrollo tumoral que vemos en ambos genotipos (Fig. R-2.B). Por tanto, esta isoforma ($p38\delta$) podría estar regulando procesos proliferativos, ya que en los ratones $p38\gamma^{-/-}$ no vemos ese aumento de la proliferación celular (Fig. R-4.B). En nuestro grupo hemos descrito en células MEF (*Mouse embryonic fibroblast*) carentes en $p38\delta$, una falta de inhibición por contacto del crecimiento celular (Cerezo-Guisado *et al.*, 2010). También hemos descrito, en estas mismas células, un aumento en la proliferación celular con respecto a las células wt, así como en la migración respecto a las células wt (Cerezo-Guisado *et al.*, 2010). Esto nos podría indicar que $p38\delta$ participa en el desarrollo tumoral mediante la regulación de procesos de proliferación y migración. En ambos procesos va a ser muy importante la regulación del citoesqueleto, para una correcta división celular y para permitir la migración y movilidad de la célula. Se han descrito como sustratos de $p38\delta$ a la proteína Tau, que participa en el ensamblaje de microtúbulos (Cuenda & Rosseau, 2007), así como la proteína “*stathmin*” que también interacciona con microtúbulos (Parker *et al.*, 1998), poniendo de manifiesto su implicación en la dinámica de microtúbulos en la célula. También hemos observado que los animales carentes en $p38\delta$ presentan, en fases tempranas de la CU (tras el tratamiento con DSS), menor índice de apoptosis que los animales $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-5.B), lo que también contribuiría a un mayor desarrollo tumoral, pues al tener más proliferación celular y menor apoptosis, presentarían una menor descamación del epitelio intestinal que el resto de genotipos, dando lugar a la aparición de tumores.

Tanto en la proliferación como en la apoptosis van a participar un amplio número de moléculas que van a ser las encargadas de regular ambos procesos, positiva o negativamente. Se ha descrito que en tejidos dañados, tanto las células epiteliales como las estromales, expresan una amplia variedad de MMPs (Gill & Parks, 2008), participando en procesos como diferenciación, migración, proliferación y supervivencia celular (Davies *et al.*, 1993). Se ha observado que las MMPs son las proteinasas predominantes en la mucosa intestinal durante las enfermedades inflamatorias y, se ha descrito, que una de las MMPs que aparece sobre-expresada es la MMP9. Además, también se ha relacionado la presencia de estas MMPs con el desarrollo y progresión tumoral (Garg *et al.*, 2011; Castaneda *et al.*, 2005). Observamos que los animales $p38\delta^{-/-}$ y, en menor grado los $p38\gamma/\delta^{-/-}$, presentaban un aumento en los niveles de proteína MMP9 en el colon tras el tratamiento con AOM/DSS (Fig. R-11.C). Sorprendentemente también vemos, que los niveles de mRNA de MMP9 en los animales $p38\delta^{-/-}$ son los más bajos encontrados tras el tratamiento, en comparación con el resto de genotipos (Fig. R-11.A). Este resultado podría indicar una posible regulación post-transcripcional de esta proteína por parte de $p38\delta$, ya que las MMPs están fuertemente reguladas a este nivel, principalmente mediante la estabilización del mRNA (Sternlicht & Werb, 2001). Por tanto, la falta de $p38\delta$ podría estar contribuyendo a aumentar dicha estabilidad. Por otro lado, la actividad de las MMPs puede estar regulada por proteínas activadoras o por inhibidores endógenos (TIMPs) (Sternlicht & Werb, 2001). En nuestro grupo, hemos descrito en células MEF carentes en $p38\delta$, un aumento en la actividad de MMP2 y de MMP9, con respecto a células wt y células $p38\gamma^{-/-}$ (Cerezo-Guisado *et al.*, 2010), por lo que $p38\delta$ también podría estar regulando la actividad de MMP9 mediante la regulación de moléculas activadoras/inhibidoras de MMP9, para así contribuir a la activación de las MMP9 y, como

consecuencia, al desarrollo tumoral mas acusado que observamos tanto en animales $p38\delta^{-/-}$ como $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-2.B).

En la mayoría de los tumores, se ha encontrado en el microambiente tumoral tanto células inmunes como mediadores de la inflamación, como citoquinas o quimioquinas. Además, estudios epidemiológicos han mostrado que la inflamación crónica predispone al individuo a la aparición de tumores (Mantovani *et al.*, 2008), por lo que para poder entender la implicación de $p38\delta$ en el desarrollo tumoral en el modelo de CAC también analizamos la expresión de diferentes citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias. El análisis de la síntesis de citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias en los animales $p38\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con AOM/DSS (Fig. R-12) mostró un aumento en los niveles de las citoquinas $TNF\alpha$ e IL6 con respecto al wt (Fig. R-12.B; R-12.D). Ambas citoquinas desempeñan un importante papel en la promoción del crecimiento tumoral, promoviendo la supervivencia de las células tumorales así como estimulando la proliferación de las células epiteliales, promoviendo tolerancia inmunitaria y potenciando procesos anti-apoptóticos (Saleh & Trinchieri, 2011; Terzic *et al.*, 2010). Por lo que, ambas proteínas contribuirían al mayor desarrollo tumoral observado en estos animales. Por otro lado, también observamos un aumento en la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL10 en ratones $p38\delta^{-/-}$ tratados con AOM/DSS (Fig. R-12.A), cuya contribución al desarrollo tumoral es bastante controvertida. Por un lado presenta una función anti-tumoral, participando en la regulación de linfocitos Treg que contribuyen a mantener la homeostasis de la mucosa y a inhibir el cáncer de colon. Pero por el otro, también tiene una función pro-tumoral, inhibición la inmunidad adaptativa, ayudando al tumor a escapar del control del sistema inmune (Lin & Karin, 2007). En nuestros ratones parece desempeñan una función pro-tumoral, ya que este aumento en la expresión de la IL10 correlaciona con un fenotipo donde se desarrollan más tumores (Fig. R-2.B) y de mayor tamaño (Fig. R-2.D) que los observados en los animales wt, cuya expresión de IL10 es más baja (Fig. R-12.A). También se ha descrito que en tumores ya establecidos, como los que observamos en nuestros ratones carentes en $p38\delta$, se ha observado un aumento en la producción de la citoquina IL10 (Porta *et al.*, 2009), coincidiendo con nuestros resultados (Fig. R-12.A). Por lo que en estos animales, este aumento en la expresión de la IL10 parece contribuir positivamente al crecimiento tumoral. También observamos que los ratones $p38\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con AOM/DSS, son los que presentan unos niveles más bajos de producción de IL1 β (Fig. R-12.B), lo que también se ha descrito en tumores ya establecidos, donde los TAM tienen una menor producción de dicha citoquina (Porta *et al.*, 2009). Por tanto los animales carentes en $p38\delta$ presentan un perfil de producción de citoquinas que podrían potenciar e incrementar el desarrollo tumoral.

Nuestros resultados sugieren que, dentro de las $p38$ MAPKs alternativas, la proteína $p38\delta$ es la principal isoforma implicada en la regulación del desarrollo tumoral en el modelo de CAC en ratones.

La isoforma $p38\delta$ participa en la regulación de la infiltración de neutrófilos en los modelos de CU y CAC en ratones.

En situaciones de inflamación o daño tisular, los neutrófilos son las células el sistema inmune que primero van a migrar a la zona y, al mismo tiempo, se produce un aumento significativo en el número de neutrófilos circulantes (Woodruff *et al.*, 2011). Mediante el estudio de biopsias de pacientes con inflamación intestinal, se ha descrito que los neutrófilos son la población de células inmunes mas abundante en el epitelio intestinal, tanto en la CU como en la enfermedad de Crohn (Woodruff *et al.*, 2011). Estos neutrófilos van a participar en la defensa de la mucosa frente a patógenos, mediante la secreción de sustancias anti-microbianas y ROS. Al mismo tiempo, participan en la secreción de

sustancias quimio-tácticas para el reclutamiento de células dendríticas o macrófagos hacia la zona de inflamación, así como la secreción de sustancias que ayudan a la diferenciación y activación de los macrófagos (Mumy & McCormick, 2009). Como resultado de la actividad anti-microbiana que desempeñan los neutrófilos se generan moléculas dañinas para las células de la mucosa intestinal, como ROS o iNOS, que pueden generar daños en el DNA e inestabilidad cromosómica, contribuyendo a la aparición de tumores (Hofman, 2010). Por tanto, una inapropiada respuesta de estas células puede conllevar un daño tisular, así como, la cronicidad del proceso inflamatorio que puede derivar en la aparición de cáncer.

Contrariamente a lo que cabría esperar, observamos que tanto los ratones $p38\delta^{-/-}$ como los $p38\gamma/\delta^{-/-}$, tras el tratamiento con AOM/DSS, presentaron una infiltración de neutrófilos mucho más baja que la de los animales wt y $p38\gamma^{-/-}$ (Fig. R-14.B). Estos dos genotipos son los que mayor número y mayor tamaño de tumores presentan (Fig. R-2.B; R-2.D). La falta de neutrófilos en la mucosa puede contribuir al desarrollo tumoral, al producirse un fallo en la fase inicial del proceso “inmuno-edición”, en la cual se eliminan las células tumorales (Swan & Smyth, 2007). Ya en las fases tempranas del proceso inflamatorio (CU), paso previo a la aparición del tumor, observamos que los ratones $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, aunque presentan úlceras en la mucosa intestinal (Fig. R-18.B), también presentan muy baja infiltración de neutrófilos (Fig. R-28.B). Estos resultados sugieren que la falta de neutrófilos contribuye al desarrollo tumoral observado en ambos genotipos.

También observamos, tras el tratamiento con DSS, una baja infiltración de macrófagos en ratones $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-27.B), quizá debida a la baja presencia de neutrófilos en la mucosa, que participan en el reclutamiento y activación de dichos macrófagos (Mumy & McCormick, 2009). Esta falta de macrófagos podría ser la responsable de los bajos niveles de $TNF\alpha$ detectados tras el tratamiento con DSS en los ratones $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-26.B), lo que a su vez podría contribuir a la falta de secreción de moléculas de adhesión que ayudarían en el reclutamiento de los neutrófilos. Por tanto, la isoforma $p38\delta$ podría estar participando en la regulación de la infiltración de los neutrófilos y los macrófagos en el modelo de CU y, sólo de neutrófilos, en el caso del modelo de CAC.

La falta de infiltración de neutrófilos podría deberse a defectos en la migración (menor movilidad de los neutrófilos) en donde la $p38\delta$ podría desempeñar algún papel como regulador en la remodelación del citoesqueleto celular para permitir la movilización de la célula, interactuando con proteínas que se acoplen a microtúbulos como es el caso de Tau o “*stathmin*”, que ya se han descrito como sustratos de $p38\delta$ (Cuenda & Rosseau, 2007; Parker *et al.*, 1998); o a un defecto en la producción de quimioquinas o en la capacidad de los neutrófilos a responder a las mismas, debido por ejemplo a un defecto en la expresión o en la movilización de receptores de quimioquinas desde el citoplasma hasta la superficie de la membrana celular para hacerlos funcionales. En este sentido, además del posible papel de $p38\delta$ en la reordenación del citoesqueleto para la movilización de los receptores, se ha descrito que esta quinasa también participa en el proceso de movilización y secreción de vesículas de insulina en las células β del páncreas, mediante su interacción con PKD1 (Sumara *et al.*, 2009).

Regulación de β -catenina en los modelos de CU y CAC en ratones $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$.

Otra proteína que participa ampliamente en el desarrollo tumoral del colon, regulando procesos proliferativos y de diferenciación celular, es la β -catenina. Los niveles de esta proteína están regulados por su estado de fosforilación. La principal proteína encargada

de fosforilar a β -catenina es la proteína GSK3. Tras ser fosforilada, la β -catenina queda marcada para ser ubiquitinada y degradada vía proteasoma, regulando así su actividad, ya que no se transloca al núcleo para ejercer su función (Gao & Chen, 2009). Se ha descrito que en el cáncer de colon se da una estabilización de la β -catenina en el citoplasma de las células epiteliales de la mucosa intestinal, lo que hace que esta proteína se vaya al núcleo, donde activa factores de transcripción como Tcf4, promoviendo proliferación y ciclo celular (Staal *et al.*, 2002). Nuestros resultados muestran que tanto en el caso de los animales $p38\gamma^{-/-}$ como en el de los $p38\gamma/\delta^{-/-}$ existe una bajada más marcada en los niveles totales de esta proteína, tras el tratamiento con AOM/DSS, que en el resto de genotipos (Fig. R-8.B). Estos resultados correlacionan con una bajada en la fosforilación de GSK3 (Fig. R-8.C), lo que implica un aumento en su actividad. Este aumento de la actividad de GSK3 se traduciría en un aumento en la fosforilación de β -catenina, que se degradaría, produciendo el descenso de los niveles de β -catenina observados (Fig. R-8.B). Por tanto, la falta de $p38\gamma$ podría estar activando la cascada GSK3/ β -catenina, causando un aumento en la degradación de β -catenina, lo que podría contribuir a la disminución de la proliferación mediada por β -catenina en estos ratones tratados con AOM/DSS.

La isoforma $p38\gamma$ tiene una característica que la diferencia del resto de $p38$ MAPKs, ya que presenta una zona de unión a dominios PDZ en su extremo C-terminal (Hasegawa *et al.*, 1999). Dentro del complejo multi-proteico que se forma en la membrana plasmática como respuesta a la interacción de Wnt con su ligando, encontramos a GSK3 inactiva y unida a otras proteínas, entre las que está APC (Li *et al.*, 2002). Se ha descrito que la proteína APC puede interaccionar con la SAP97/hDlg a través de su dominio PDZ2 (Gaudet *et al.*, 2000), que es un sustrato ya descrito de $p38\gamma$, al interaccionar con ella a través de sus dominios PDZ1 y PDZ3 (Sabio *et al.*, 2005). También se ha descrito que APC puede interaccionar con $p38\gamma$ (Zumbrunn *et al.*, 2000). Por tanto, ante la falta de $p38\gamma$, el complejo multi-proteico que forma APC junto a otras proteínas como GSK3 (inactiva) se podría ver afectado, aumentando su inestabilidad haciendo que se libere GSK3 (activándose) y en consecuencia, fosforilando la β -catenina para su degradación vía proteasoma, lo que daría lugar a una bajada de los niveles de β -catenina como observamos en los ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$, pero no en los wt y $p38\delta^{-/-}$ (Fig. R-8.B). En los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ la bajada de los niveles de β -catenina es más marcada que en los animales $p38\gamma^{-/-}$ (Fig. R-8.B), lo que podría estar indicando la participación de $p38\delta$ y, probablemente, otras moléculas en la activación de la cascada GSK3/ β -catenina, además de la falta de $p38\gamma$. Por el contrario, en los animales wt y $p38\delta^{-/-}$ se observa un leve descenso de los niveles de β -catenina independientemente del estado fosforilado de GSK3 (Fig. R-8.C), lo que podría sugerir que esta bajada sea debida a la translocación de β -catenina a núcleo, asociándose a factores de transcripción que promuevan el desarrollo tumoral. Es una posibilidad que no se puede descartar ya que en nuestros resultados mostramos un WB realizado a partir de extractos totales de colon, sin realizar un fraccionamiento subcelular para determinar la localización de la β -catenina.

Por otro lado, en estadios tempranos de la CU, tras el tratamiento con DSS, observamos un aumento de los niveles de β -catenina (Fig. R-22.B), así como de GSK3 inactiva (pGSK3) tanto en el citoplasma como en el núcleo de células epiteliales de ratones wt, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-22.C). Además, en el caso de los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ este aumento de pGSK3 mayoritariamente se observa en el núcleo, al igual que vemos una localización principalmente nuclear de GSK3 (Fig. R-22.C). Se ha descrito que los niveles de GSK3 β se ven incrementados en núcleo en respuesta a estímulos que promueven apoptosis, provocando la activación de caspasas, principalmente caspasa 9 y caspasa 3. Además, esta acumulación es independiente del estado de fosforilación de la proteína (Meares & Jope, 2007; Bijur & Jope, 2001). La acumulación de GSK3 β observada

en el núcleo, en nuestros ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig. R-22.C), podría ser uno de los motivos del incremento en la apoptosis que presentan estos ratones (Fig. R-5.B). Además, una de las principales caspasas implicadas en la apoptosis medida por GSK3 es la caspasa 3. Nuestros resultados muestran que efectivamente, en el caso de los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ existe una bajada en los niveles de caspasa 3 inactiva respecto a los niveles de los animales wt (Fig. R-5.C). Por lo que, ambas isoformas, tanto $p38\gamma$ como $p38\delta$, estarían implicadas en la localización subcelular de GSK3 β , determinando su participación en el procesos de apoptosis.

Las MAPKs en los modelos de CU y CAC en ratones wt, $p38\gamma^{-/-}$, $p38\delta^{-/-}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$.

En los resultados de esta tesis, no observamos fosforilación de ninguna de las isoformas de p38MAPKs en el modelo de CAC (Fig. R.6.E) y en el modelo de CU, sólo observamos una leve señal de activación de $p38\alpha$ en los animales wt y $p38\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS (Fig. R-19.A). Pero en ninguno de los dos modelos hemos visto activación de las isoformas $p38\gamma$ y $p38\delta$. Por tanto, estos resultados sugieren que la implicación de las isoformas $p38\gamma$ y $p38\delta$ en el desarrollo de estas patologías no depende de su estado de activación, si no de su presencia o no en la célula. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos descrito la participación de la isoforma $p38\gamma$ en procesos implicados en la transcripción génica independientemente de su actividad catalítica, participando en la regulación de complejos nucleares (Sabio *et al.*, 2010). $p38\gamma$ regula de forma independiente a su actividad catalítica, la formación de complejos nucleares entre la proteína SAP97/hDlg y los factores de “*splicing*” PSF y p54^{nrb}, y diferentes moléculas de mRNA (Sabio *et al.*, 2010).

En situaciones de inflamación las ERK1/2 pueden ser activadas, independientemente de la vía de Ras, por estímulos pro-inflamatorios como citoquinas (TNF α) o por estimulación de los TLRs (Kyriakis & Avruch, 2012). En macrófagos wt, la estimulación del TLR4 con LPS, hace que se active la cascada de señalización ERK1/2 vía Tpl2 (López-Peláez *et al.*, 2011). En nuestro grupo, hemos descrito recientemente, que en macrófagos $p38\gamma/\delta^{-/-}$ estimulados con LPS, no se produce la activación de las proteínas ERK1/2 debido a los bajos niveles de Tpl2 (Risco *et al.*, 2012). En el modelo de CU observamos que al igual que en los macrófagos wt, las células epiteliales del colon de animales wt, tras el tratamiento con DSS, presentaron activación de ERK1/2 (Fig. R-20.B). Por el contrario, como ya hemos descrito en macrófagos $p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Risco *et al.*, 2012), en las células epiteliales del colon de animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ tratados con DSS, no observamos fosforilación de ERK1/2 (Fig. R-20.B), lo que sugiere la regulación de la actividad de ERK1/2, mediada por TLR, por parte de las isoformas $p38\gamma$ y $p38\delta$ también en las células epiteliales del colon tras el tratamiento con DSS. Al observar el estado de fosforilación de ERK1/2 en las células epiteliales de ratones $p38\gamma^{-/-}$ y $p38\delta^{-/-}$ observamos que, a los 5 días de tratamiento con DSS, hay activación de ERK1/2 en las células $p38\delta^{-/-}$ (Fig. R-20.B) pero no en las células $p38\gamma^{-/-}$ (Fig. R-20.B), lo que podría indicar una mayor implicación de $p38\gamma$ en la regulación de la actividad de ERK1/2 mediada por TLRs. Además, en extractos totales de colon de ratones tratados con DSS, observamos que los animales deficientes en $p38\gamma$ y $p38\gamma/\delta$ no presentan apenas Tpl2, comparado con los wt y los $p38\delta$ (Fig. D-1), este resultados coincide con la falta de activación de ERK1/2 en estos animales.

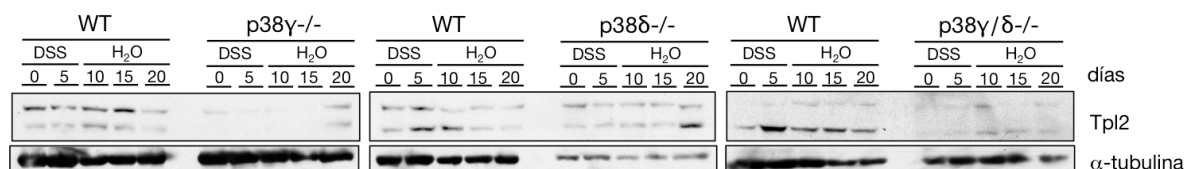


Fig. D-1. Niveles de proteína Tpl2 tras el tratamiento con DSS. WBs representativos de los niveles de proteína Tpl2 analizados en extractos totales de colon de ratones wt, p38 γ ^{-/-}, p38 δ ^{-/-} y p38 γ/δ ^{-/-} a los 0, 5, 10, 15 y 20 días del inicio del tratamiento con DSS. Se muestran los niveles de proteína α -tubulina, como control de carga de la electroforesis en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, también observamos como una segunda activación de ERK1/2 en extractos totales de colon, que es más acusada en los animales wt, tras 15 días del inicio del tratamiento con DSS (Fig. R-20.A). Pudiendo participar en procesos de regeneración del tejido dañado induciendo proliferación, mediante la activación de factores de transcripción (Kyriakis & Avruch, 2012) y esta activación sería dependiente de la presencia de las proteínas p38 γ o p38 δ .

La actividad de las MAPKs está regulada tanto por quinasas que las fosforilan y activan, como por fosfatasa que las desactivan (Liu *et al.*, 2007). Tanto la intensidad como la duración de la actividad de las MAPKs va a estar regulada por las MKPs (*MAPK phosphatases*), que son un grupo de fosfatasa encargadas de desfosforilar en treonina y tirosina (Huang *et al.*, 2009). Las principales MKPs implicadas en la desactivación de las JNKs son la MKP1 y la MKP2 (Liu *et al.*, 2007), pero es la MKP1 la que se activa vía TLR (Huang *et al.*, 2009). Por lo que, en el modelo de CU, donde se activan un amplio número de cascadas dependientes de TLR, cabría esperar que la fosfatasa que principalmente regule a las quinasas JNKs sea la MKP1. Además, se ha descrito que ante la activación del TLR en respuesta a infecciones microbianas, las ERK1/2 actuarían fosforilando a MKP1, lo que provoca una estabilización de la fosfatasa aumentando su tiempo de acción y disminuyendo la actividad tanto de las JNKs (Liu *et al.*, 2007). En nuestros ratones, observamos que tras el tratamiento con DSS, los animales p38 γ ^{-/-} y p38 δ ^{-/-} presentan una desactivación de las JNKs más rápida que los ratones wt y p38 γ/δ ^{-/-} (Fig. R-20.C), pero esta desactivación no correlaciona con una fosforilación más sostenida de ERK1/2 que pudiese estar estabilizando a la MKP1 (Fig. R-20.A). Por lo que estos datos sugieren que las isoformas p38 γ y p38 δ podrían estar regulando la actividad de las JNKs mediante la regulación de esta fosfatasa. Además, parecen presentar un comportamiento compensatorio, ya que al deleccionar ambas isoformas, no se observa este comportamiento en las JNKs (Fig. R-20.C)

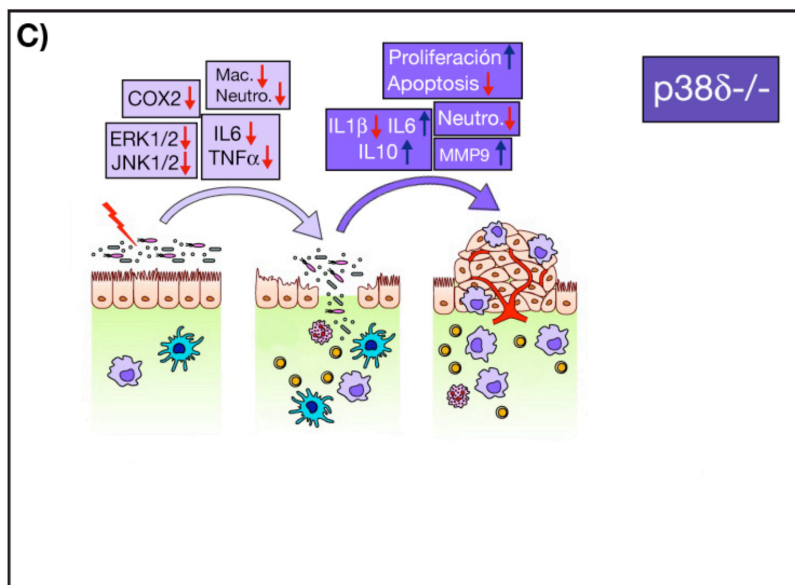
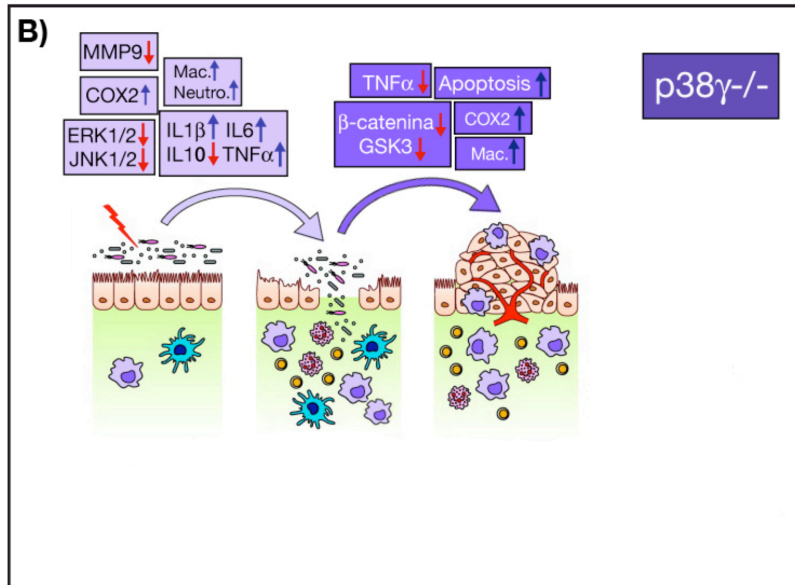
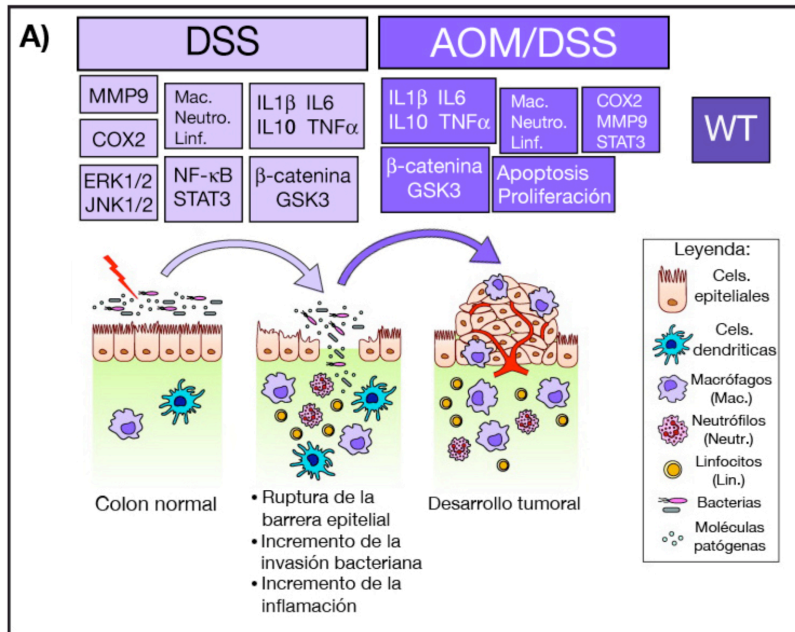


Fig. D-2. Modelo de la producción de moléculas inflamatorias y del estado de procesos implicados en inflamación y tumorigénesis en ratones wt, p38 γ ^{-/-} y p38 δ ^{-/-}. **A)** El tratamiento con AOM/DSS induce colitis crónica así como la aparición de tumores en ratones. Tras el daño epitelial, mediante el uso de productos químicos (DSS), la flora intestinal invade la mucosa del colon, activando el sistema inmune, produciendo una serie de citoquinas, pro-inflamatorias (IL1 β , IL6, TNF α), así como anti-inflamatorias (IL10) para controlar y acotar la respuesta inflamatoria, así como otros mediadores de inflamación (COX2). El sistema inmune al activarse, también va a movilizar células inmunes que respondan ante este daño y al ataque de la flora intestinal (macrófagos, neutrófilos y linfocitos) La ruptura de la barrera intestinal también produce un aumento en la activación de factores de transcripción (NF- κ B, STAT3, β -catenina), así como de factores remodeladores de la matriz extracelular (MMP9), y la activación de cascadas de señalización (ERK1/2, JNKs) que promueven proliferación y ciclo celular, para la regeneración del epitelio dañado. En los tumores ya establecidos, sigue existiendo un crecimiento celular que está potenciado por factores de transcripción (STAT3) y proteínas remodeladoras de la matriz extracelular (MMP9), así como altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α) que estimulan el desarrollo tumoral. En el caso de los animales p38 γ ^{-/-} (**B**) y p38 δ ^{-/-} (**C**) hay un aumento (↑) o un descenso (↓) de los niveles de diferentes moléculas respecto a los observados en los ratones wt, que indican que tanto en los estadios tempranos (CU) como en los estadios tardíos del modelo de CAC, la isoforma p38 γ participa en la regulación de mediadores y células inflamatorias, haciendo que los ratones carentes en esta proteína presenten mayor inflamación de la mucosa. Por otro lado, estos resultados muestran que la isoforma p38 δ participa en la regulación de mediadores que controlan el desarrollo tumoral, ya que los animales carentes en dicha proteína presentan un mayor número y tamaño tumoral. Figura adaptada de Zaki *et al.* 2011.

CONCLUSIONES

- 1.- La isoforma p38 γ parece ser la principal isoforma implicada en los procesos inflamatorios que se dan tanto en la CU como en el CAC, regulando la producción de citoquinas y moléculas pro-inflamatorias (COX2), el reclutamiento de células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos), así como procesos apoptóticos.
- 2.- La isoforma p38 δ parece ser la principal implicada en el desarrollo de tumores en el modelo de CAC, mediante la regulación de procesos como la proliferación celular y la apoptosis, así como la regulación de la expresión y actividad de la MMP9.
- 3.- La isoforma p38 δ participa en la regulación de la infiltración de neutrófilos tanto en el modelo de CAC como en el de CU.
- 4.- La quinasa p38 γ regula la actividad de GSK3 y, en consecuencia, los niveles de β -catenina, en el modelo de CAC.
- 5.- Nuestros resultados indican que las isoformas de p38MAPKs (p38 γ y p38 δ) alternativas participan en el desarrollo de CAC u CU independientemente de su actividad quinasa.
- 6.- p38 γ y p38 δ regulan la activación de las quinasas ERK1/2 y la desactivación de JNK1/2 , tras el tratamiento con DSS.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, M. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 10:131-143.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7:834–846.
- Alas, S., Emmanouilides, C., & Bonavida B. (2001). Inhibition of interleukin-10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res.* 7:709–723.
- Alexander, W. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2:410–416.
- Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, MG., Sica, A., & Mantovani, A. (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 18:3–10.
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., & Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66:1–9.
- Ambrosino, C., & Nebreda, AR. . (2001). Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell.* 93:47–51.
- Aoki, K., & Taketo, MM. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Biol.* 120:3327-3335.
- Apte, R., & Voronov, E. (2002). Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol.* 12:277-290.
- Baldwin, A.J. (1996). The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14:649-683.
- Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.
- Baugh, M., Perry, MJ., Hollander, AP., Davies, DR., Cross, SS., Lobo, AJ., Taylor, CJ., & Evans, GS. (1999). Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117:814–822.
- Baumgart, D., & Dignass, AU. (2002). Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5:685-694.
- Becker, C., Fantini, MC., Schramm, C., Lehr, HA., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, PR., Blessing, M., Rose-John, S., & Neurath, MF.

- (2004). TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21:491–501.
- Behrens, J., & Lustig, B. . (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol.* 48:477-487.
- Bene, L., Falus, A., Baffy, N., & Fulop, AK. (2011). Cellular and molecular mechanisms in the two major forms of inflammatory bowel disease. *Pathol Oncol Res.* 17:463–472.
- Berg, D., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, MW., & Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 98:1010 –1020.
- Bijur, G., & Jope RS. (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem.* 276 (40):37436-37442.
- Bissahoyo, A., Pearsall, RS., Hanlon, K., Amann, V., Hicks, D., Godfrey, VL., & Threadgill, DW. (2005). Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route and diet. *Toxicol Sci.* 88(2):340-345.
- Biswas, S., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11 (10):889-896.
- Blumberg, R., & Strober, W. (2001). Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 285:643-647.
- Boivin, G., Washington, K., Yang, K., Ward, JM., Pretlow, TP., Russell, R., Besselsen, DG., Godfrey, VL., Doetschman, T., Dove, WF., Pitot, HC., Halberg, RB., Itzkowitz, SH., Groden, J., & Coffey, RJ. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124:762-777.
- Boland, C., Thibodeau, SN., Hamilton, SR., Sidransky, D., Eshleman, JR., Burt, RW., Meltzer, SJ., Rodriguez-Bigas, MA., Fodde, R., Ranzani, GN., & Srivastava, S. (1998). A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 5248-5257.
- Bollrath, J., Phesse, TJ., von Burstin, VA., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, RM., Kirchner, T., Arkan, MC., Ernst, M., & Greten, FR. (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15:91-102.

- Bollrath, J., & Greten, FR. (2009). IKK/NF- κ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep.* 10 (12):1314-1319.
- Bos, L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 49:4682–4689.
- Boulton, T., & Cobb, MH. (1991). Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul.* 2:357-371.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, JJ., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, RA., & Davis, RJ. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 17:1969–1978.
- Brennan, A., Chia, J., Trapani, JA., & Voskoboinik, I. . (2010). Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell Death Differ.* 17:607-615.
- Brinckerhoff, C., & Matrisian, LM. . (2002). Matrix metalloproteinases:a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:207-214.
- Bromberg, J., & Wang, TC. (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell* 15:79-80.
- Burgessa, A., Faux, MC., Layton, MJ., & Ramsay, RG. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis — A view from the periphery. *Exp Cell Res.* 317:2748-2758.
- Cabibi, D., Calascibetta, A., Aragona, F., Martorana, A., Campione, M., & Sanguedolce, R. (2009). Differing expression of metalloprotease and of adhesion molecules in signet-ring cell and intestinal colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 29:4417-4422.
- Cadigan, K., & Liu, YI. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Biol.* 119 (3):395-402.
- Cario, E., Gerken, G., & Podolsky, DK. (2007). Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 132:1359 –1374.
- Castaneda, F., Walia, B., Vijay-Kumar, M., Patel, NR., Roser, S., Kolachala, VL., Rojas, M., Wang, L., Oprea, G., Garg, P., Gewirtz, AT., Roman, J., Merlin, D., & Sitaraman, SV. (2005). Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 129:1991–2008.
- Castellone, M., Teramoto, H., Williams, BO., Druey, KM., & Gutkind, JS. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 310:1504–1510.

- Catlett-Falcone, R., Landowski, TH., Oshiro, MM., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, JL., Nuñez, G., Dalton, WS., & Jove, R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105–115.
- Cerezo-Guisado, M., del Reino, P., Remy, G., Kuma, Y., Arthur, JS., Gallego-Ortega, D., & Cuenda, A. (2011). Evidence of p38 γ and p38 δ involvement in cell transformation processes. *Carcinogenesis* 32(7):1093-1099.
- Chen, J., & Huang, X-F. (2009). The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther.* 8 (14):1313-1317.
- Chen, Z., Gibson, TB., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., & Cobb, MH. (2001). MAP Kinases. *Chem Rev.* 101:2449–2476.
- Cheung, P., Campbell, DG., Nebreda, AR., & Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J.* 22:5793–5805.
- Chilov, D., Kukk, E., Taira, S., Jeltsch, M., Kaukonen, J., Palotie, A., Joukov, V., & Alitalo, K. (1997). Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem.* 272:25176–25183.
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, JW., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G., & Depinho, R. (1999). Essential role for oncogene Ras in tumour maintenance. *Nature* 400:468–472.
- Cohen, P. (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* 7:353-361.
- Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:769-776.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov.* 1(4):309-315.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30 (7):1073–1081.
- Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, FC., Bagnulo, R., Ingravallo, G., Modica, S., Lo Sasso, G., Moschetta, A., Guanti, G., & Simone, C. (2007). A novel cell type-specific role of p38 α in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ.* 14:693–702.

- Court, N., Kuo, I., Quigley, O., & Bogoyevitch, MA. (2004). Phosphorylation of the mitochondrial protein Sab by stressactivated protein kinase 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 319 (1):130–137.
- Coussens, L., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer . *Nature* 420(6917):860–867.
- Cuadrado, A., & Nebreda, AR. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 429:403-417.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, YN., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, TF., Young, PR., & Lee, JC. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364(2):229-233.
- Cuenda, A., Alonso, G., Morrice, N., Jones, M., Meier, R., Cohen, P., & Nebreda, AR. . (1996). Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *EMBO J.* 15 (16):4156-4164.
- Cuenda, A., Cohen, P., Buée-Scherrer, V., & Goedert, M. (1997). Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 16 (2):295-305.
- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1773:1358-1375.
- Cullen, S., Brunet, M., & Martin, SJ. . (2010). Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.* 17:616-623.
- Curiel, T. (2007). Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest.* 117:1167–1174.
- Danese, S., Sans, M., & Fiocchi, C. (2004). Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 3:394– 400.
- Danese, S., & Mantovani, A. (2010). Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin–Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 29:3313-3323.
- Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative Colitis. *N Engl J Med.*:(365) 1713-1735.
- Dannenberg, A., & Subbaramaiah, K. (2003). Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell* 4:431–436.
- Darnell, J., Kerr, IM., & Stark, GR. (1994). Jak–STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415–1421.

- Davies, B., Waxman, J., Wasan, H., Abel, P., Williams, G., Krausz, T., Neal, D., Thomas, D., Hanby, A., & Balkwill, F. (1993). Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumour grade and invasion. *Cancer Res.* 53:5365-5369.
- de Visser, K., & Coussens, LM. (2005). The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunol Immunother.* 54:1143–1152.
- de Visser, K., Eichten, A., & Coussens, LM. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24-37.
- Dechow, T., Pedranzini, L., Leitch, A., Leslie, K., Gerald, WL., Linkov, I., & Bromberg, JF. (2004). Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10602–10607.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, IH., Han, J., Ulevitch, RJ., & Davis, RJ. . (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267:682–685.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., & Balmain, A. (2001). TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29:117-129.
- Derynck, R., & Zhang, Y.E. . (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 425:577-584.
- Dibb, N., Dilworth, SM., & Mol, CD. (2004). Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer.* 4(9):718-727.
- Dignass, A., Baumgart, DC., & Sturm, A. (2004). Review article: the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease — immunology and repair mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther.* 20 (Suppl. 4):9–17.
- Dunn, G., Old, LJ., & Schreiber, RD. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22:329–360.
- Eberhart, C., Coffey, RJ., Radhika, A., Giardiello, FM., Ferrenbach, S., & DuBois, RN. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. . *Gastroenterology* 107:1183–1188.
- Eckert, R., Efimova, T., Balasubramanian, S., Crish, JF., Bone, F., & Dashti, S. (2003). p38 mitogen-activated protein kinases on the body surface-a function for p38 δ . *J Invest Dermatol.* 120 (5):823-828.

- Eckmann, L., Nebelsiek, T., Fingerle, AA., Dann, SM., Mages, J., Lang, R., Robine, S., Kagnoff, MF., Schmid, RM., Karin, M., Arkan, MC., & Greten, FR. (2008). Opposing functions of IKK during acute and chronic intestinal inflammation. *PNAS* 105 (39):15058–15063.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161–174.
- Eisinger, A., Prescott, SM., Jones, DA., & Stafforini, DM. (2007). The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 82:147-154.
- Elson, C., Balfour, R., Tennyson, GS., & Riddell, RH. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-1367.
- Elzagheid, A., Buhmeida, A., Korkeila, E., Collan, Y., Syrjänen, K., & Pyrhönen :. (2008). Nuclear β -catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 14 (24):3866-3871.
- Enslen, H., Raingeaud, J., & Davis, RJ. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem.* 273 (3):1741–1748.
- Erdman, S., Sohn, JJ., Rao, VP., Nambiar, PR., Ge, Z., Fox, JG., & Schauer, DB. . (2005). CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 65:3998– 4004.
- Fearnhead, N., Britton, MP., & Bodmer, WF. (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 10 (7):721-733.
- Fearon, E., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Feijoo, C., Campbell, DG., Jakes, R., Goedert, M., & Cuenda, A. (2005). Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J Cell Sci.* 118:397-408.
- Fiocchi, C. (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 273:G769-G775.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Devière, J., & Rutgeerts, P. (2004). Deficient host–bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly polymorphism is associated with Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Gut* 53(7):987–992.

- Freshney, N., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., & Saklatvala, J. . (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78(6):1039-1049.
- Fridlender, Z., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, GS., & Albelda, SM. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16:183–194
- Fujimura, Y., Hosobe, M., & Kihara, TU. . (1992). Ultrastructural study of M cells from colonic lymphoid nodules obtained by colonoscopic biopsy. *Dig Dis Sci*. 37:1089–1098.
- Fukata, M., Michelsen, KS., Eri, R., Thomas, LS., Hu, B., Lukasek, K., Nast, CC., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M., & Abreu, MT. (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 288:1055-1065.
- Fukata, M., Vamadevan, AS., & Abreu, MT. (2009). Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol*. 21:242–253.
- Fukata, M., Hernandez, Y., Conduah, D., Cohen, J., Chen, A., Breglio, K., Goo, T., Hsu, D., Xu, R., & Abreu, MT. (2009). Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm Bowel Dis*. 15(7):997–1006.
- Gallo, K., & Johnson, GL. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3 (9):663–672.
- Gao, C., & Chen, Y-G. (2009). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell signal*. 22(5):717-727.
- Garg, P., Sarma, D., Jeppsson, S., Patel, NR., Gewirtz, AT., Merlin, D., & Sitaraman, SV. (2010). MMP-9 functions as a tumor suppressor in colitis-associated cancer. *Cancer Res*. 70(2):792.
- Garg, P., Jeppsson, S., Dalmasso, G., Ghaleb, AM., McConnell, BB., Yang, VW., Gewirtz, AT., Merlin, D., & Sitaraman, SV. (2011). Notch1 regulates the effects of matrix metalloproteinase-9 on colitis-associated cancer in mice. *Gastroenterology* 141:1381-1392.
- Garrett, W., Gordon, JL., & Glimcher, LH. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140:859-870.
- Gaudet, S., Branton, D., & Lue, RA. (2000). Characterization of PDZ-binding kinase, a mitotic kinase. *PNAS* 97 (10):5167-5172.

- Geissmann, F., Manz, MG., Jung, S., Sieweke, MH., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327(5966): 656–661.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
- Gill, S., & Parks, WC. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(6-7):1334–1347.
- Gillespie, M., Le Grand, F., Scimè, A., Kuang, S., von Maltzahn, J., Seale, V., Cuenda, A., Ranish, JA., & Rudnicki, MA. (2009). p38- γ -dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program. *J Cell Biol.* 187 (7):991-1005.
- Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., & Cohen, P. (1997). Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* 16 (12):3563–3571.
- Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., & Cohen, P. (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409:57–62.
- Gordon, S., & Taylor, PR. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5:953-964.
- Greenhough, A., Smartt, HJ., Moore, AE., Roberts, HR., Williams, AC., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30 (3):377-386.
- Greenhough, A., Wallam, CA., Hicks, DJ., Moorghen, M., Williams, AC., & Paraskeva, C. (2010). The proapoptotic BH3-only protein Bim is downregulated in a subset of colorectal cancers and is repressed by antiapoptotic COX-2/PGE2 signalling in colorectal adenoma cells. *Oncogene* 29:3398-3410.
- Greten, F., Eckmann, L., Greten, TF., Park, JM., Li, ZW., Egan, LJ., Kagnoff, MF., & Karin, M. (2004). IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118:285-296.
- Greten, F., & Karin, M. (2004). The IKK/NF- κ B activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 206:193–199.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, GY., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., & Karin, M. (2009).

- IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* 15:103-113.
- Grivennikov, S., Greten, FR., & Karin, M. . (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140 (6):883-899.
- Gupta, R., & Dubois, RN. . (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1:11–21.
- Halawani, D., Mondeh, R., Stanton, LA., & Beier, F. . (2004). p38 MAP kinase signaling is necessary for rat chondrosarcoma cell proliferation. *Oncogene* 23:3726–3731.
- Han, J., Lee, JD., Bibbs, L., & Ulevitch, RJ. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173):808-811.
- Hanahan, D., & Weinberg, RA. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646-674.
- Hancock, J. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:373-384.
- Hasegawa, M., Cuenda, A., Spillantini, MG., Thomas, GM., Buée-Scherrer, V., Cohen, P., & Goedert, M. (1999). Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem.* 274 (18):12626-12631.
- Hayashi, M., Tapping, RI., Chao, TH., Lo, JF., King, CC., Yang, Y. and Lee, JD. (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 276(12):8631-8634.
- Heinrich, P., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. . (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 334:297–314.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., & Strauss, M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol.* 19 2690–2698.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. & Maru, Y. . (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* 8:1369–1375.
- Hofma, P. (2010). Pathobiology of the neutrophil-intestinal epithelial cell interaction: Role in carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 16 (46):5790-5800.

- Hold, G., Rabkin, CS., Chow, WH., Smith, MG., Gammon, MD., Risch, HA., Vaughan, TL., McColl, KE., Lissowska, J., Zatonski, W., Schoenberg, JB., Blot, WJ., Mowat, NA., Fraumeni, JF, Jr., & El-Omar, EM. (2007). A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology* 132:905–912.
- Hou, Z., Falcone, DJ., Subbaramaiah, K., & Dannenbergthe, AJ. (2011) Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1b autoamplification *Carcinogenesis* 32 (5):695-702.
- Howe, K., Gauldie, J., & McKay, DM. . (2002). TGF-beta effects on epithelial ion transport and barrier: reduced Cl- secretion blocked by a p38 MAPK inhibitor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283:C1667–1674.
- Howe, K., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., & McKay, DM. (2005). Transforming growth factorbeta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability. *Am J Pathol*. 167:1587–1597.
- Huang, G., Shi, LZ., & Chi H. . (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48:161-169.
- Hussain, S., Hofseth, LJ., & Harris, CC. (2003). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3:276–285.
- Inomata, M., Ochiai, A., Akimoto, S., Kitano, S., & Hirohashi, S. (1996). Alteration of beta-catenin expression in colonic epithelial cells of familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*. 56:2213-2217.
- Iñesta-Vaquera, F., Sabio, G., Kuma, Y., & Cuenda, A. (2008). Alternative p38 pathways. *Topics in current genetics: SAPK signaling*. 20:17-32.
- Iñesta-Vaquera, F., Campbell, DG., Arthur, JS., & Cuenda, A. (2010). ERK5 pathway regulates the phosphorylation of tumour suppressor hDlg during mitosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 399 (1):84-90.
- Ishikawa, T., & Herschman, HR. (2010). Tumor formation in a mouse model of colitis associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression. *Carcinogenesis* 31:729-736.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., & Nagata, S. . (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243.
- Jawad, N., Direkze, N., & Leedham, SJ. (2011). Inflammatory bowel disease and colon cancer.r. *Recent Results Cancer Res*. 185:99-115.

- Jenkins, S., Ruckerl, D., Cook, PC., Jones, LH., Finkelman, FD., van Rooijen, N., MacDonald, AS., & Allen, JE. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science* 332(6035):1284–1288.
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, JA., Lin, S., & Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *J Biol Chem*. 271 (30):17920–17926.
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, RJ., & Han, J. (1997). Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ . *J Biol Chem*. 272 (48):30122–30128.
- Jin, Z., & El-Deiry, WS. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 4(2):139-163.
- Johansson, M., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, GC. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *PNAS* 105 (39):15064–15069 .
- Junttila, M., Ala-Aho, R., Jokilehto, T., Peltonen, J., Kallajoki, M., Grenman, R., Jaakkola, P., Westermarck, J., & Kähäri, VM. (2007). p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 26 (36):1-13.
- Junttila, M., Li, SP., & Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 22:954-965.
- Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, AC., & Paraskeva, C. (2006). Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res*. 66:6683–6691.
- Kang, Y., Otsuka, M., van den Berg, A., Hong, L., Huang, Z., Wu, X., Zhang, D-W., Vallance BA., Tobias, PS., & Han, J. (2010). Epithelial p38 α controls immune cell recruitment in the colonic mucosa. *PLoS ONE* 6 (6):e10000934.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 3:221–227.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 441:431-436.

- Kaser, A., Niederreiter, L., & Blumberg, RS. (2011). Genetically determined epithelial dysfunction and its consequences for microflora–host interactions. *Cell Mol Life Sci.* 68:3643–3649.
- Khayrullina, T., Yen, JH., Jing, H., & Ganea, D. (2008). In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J Immunol.* 181:721–735.
- Kitajima, S., Takuma, S., & Morimoto, M. (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim.* 48(·):137-143.
- Kitajima, S., Takuma, S., & Morimoto, M. (2000). Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim.* 49 (1):9-15.
- Kitakata, H., Nemoto-Sasaki, Y., Takahashi, Y., Kondo, T., Mai, M., & Mukaida, N. (2002). Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res.* 62:6682–6687.
- Knebel, A., Morrice, N., & Cohen, P. (2001). A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38 δ . *EMBO J.* 20 (16):4360–4369.
- Knebel, A., Haydon, CE., Morrice, N., & Cohen, P. (2002). Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem J.* 367 (2):525–532.
- Kolligs, F., Bommer, G., & Göke, B. (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 66:131-144.
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mule, J., Kerr, WG., Jove, R., Pardoll, D., & Yu, H. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* 11:1314–1321.
- Kukkonen-Macchi, A., Sicora, O., Kaczynska, K., Oetken-Lindholm, C., Pouwels, J., Laine, L., & Kallio, MJ. (2011). Loss of p38 γ MAPK induces pleiotropic mitotic defects and massive cell death. *J Cell Sci.* 124 216-227.
- Kuma, Y., Campbell, DG., & Cuenda, A. (2004). Identification of glycogen synthase as a new substrate for stress-activated protein kinase 2b/p38 β . *Biochem J.* 379(Pt 1):133-139.
- Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Marquez, R., & Cuenda, A. (2005). BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 280(20):19472-19479.

- Kyriakis, J., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81 (2):807-869.
- Kyriakis, J., & Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 92:689-737.
- Lauscher, J., Gröne, J., Dullat, S., Hotz, B., Ritz, JP., Steinhoff, U., Buhr, HJ., & Visekruna, A. (2010). Association between activation of atypical NF-kappaB1 p105 signaling pathway and nuclear beta-catenin accumulation in colorectal carcinoma. *Mol Carcinog.* 49:121-129.
- Lawrence, M., Shao, C., Duan, L., McGlynn, K., & Cobb, MH. (2008). The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol.* 192:11–17.
- Leach, M., & Rennick, DM. . (1998). IL-12, but not IFNgamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10–deficient mice. *J Immunol.* 161:3143–3149.
- Lechner, C., Zahalka, MA., Giot, JF., Møller, NPH., & Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (9):4355–4359.
- Lee, J., Laydon, JT., McDonnell, PC., Gallagher, TF., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, MJ., Heys, JR., Land Vatter, SW., Strickler, JE., McLaughlin, MM., Siemens, IR., Fisher, SM., Livi, GP., White JR., Adams, JL., & Young, PR. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372(6508):739-746.
- Lee, R., Albanese, C., Stenger, RJ., Watanabe, G., Inghirami, G., Haines, GK. 3rd, Webster, M., Muller, WJ., Brugge, JS., Davis, RJ., & Pestell, RG. (1999). pp60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element- binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 274:7341–7350.
- Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, II., Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, AJ., Valenzuela, DM., Yancopoulos, GD., Becher, B., Littman, DR., & Neurath, MF. (2009). RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136:257–267.
- Li, H., Pamukcu, R., & Thompson, WJ. (2002). beta-Catenin signaling: therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther.* 1:6:621-625.

- Li, Y., de Haar, C., Chen, M., Deuring, J., Gerrits, MM., Smits, R., Xia, B., Kuipers, EJ., & van der Woude, CJ. (2010). Disease-related expression of the IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* 59:227–235.
- Lin, W.-W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 117:1175–1183.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., & He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847.
- Liu, Y., Shepherd, EG., & Nelin LD. (2007). MAPK phosphatases --- regulating the immune response. *Nature Immunol.* 7:202-212.
- Livak, K., & Schmittgen, TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Loesch, M., & Chen, G. (2008). The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or no? *Front Biosci.* 13:3581-3593.
- López-Peláez, M., Soia-Castro, I., Boscá, L., Fernández, M., & Alemany, S. (2011) Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implications for NO synthase 2 expression. *Eur J Immunol.* 41(6):1733-1741.
- Lu, J., Philpott, DJ., Saunders, PR., Perdue, MH., Yang, PC., & McKay, DM. (1998). Epithelial ion transport and barrier abnormalities evoked by superantigen-activated immune cells are inhibited by interleukin-10 but not interleukin-4. *J Pharmacol Exp Ther.* 287:128–136.
- Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., Yagita, H., & Karin, M. (2004). Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF- α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 6:297–305.
- Macpherson, A., & Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303:1662–1665.
- Mähler, M., Bristol, IJ., Leiter, EH., Workman, AE., Birkenmeier, EH., Elson, CO., & Sundberg, JP. (1998). Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 274:544-551.
- Maloy, K., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, NJ., & Powrie, F. (2003). CD4+CD25+ Tr cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med.* 197:111–119.

- Maloy, K., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474:298-306.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459-465.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23 (11):549-555.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.
- Marinissen, M., Chiariello, M., Pallante, M., & Gutkind, JS. (1999). A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol Cell Biol.* 19:4289–4301.
- Marinissen, M., Chiariello, M., & Gutkind, JS. (2001). Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes. Dev.* 15:535–553.
- McGuckin, M., Eri, R., Simms, LA., Florin, TH., & Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 15:100 –113.
- McKerrow, J., Bhargava, V., Hansell, E., Huling, S., Kuwahara, T., Matley, M., Coussens, L., & Warren, R. (2000). A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med.* 6:450–460.
- McMullen, M., Bryant, PW., Glembotski, CC., Vincent, PA. & Pumiglia, KM. (2005). Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem.* 280:20995–21003
- Meares, G., & Jope RS. (2007). Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem.* 282 (23):16989-17001.
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288:G1328–G1338.
- Mertens, S., Craxton, M., & Goedert, M. (1996). SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 383 (3):273–276.

- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 122:143–159.
- Mody, N., Leitch, J., Armstrong, C., Dixon, J. and Cohen, P. (2001). Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Letters* 502: 21-24.
- Molodecky, N., & Kaplan, GG. (2010). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 6 (5):339-346.
- Moon, R., Bowerman, B., Boutros, M., & Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296:1644-1646.
- Moore, K., de Waal Malefyt, R., Coffman, RL., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19:683–765.
- Morán, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Sánchez-Pernaute, A., Torres, AJ., Díaz-Rubio, E., Iniesta, P., & Benito, M. (2010). Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2(3):151-158.
- Mumy, K., & McCormick, BA. (2009). The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 9 (6):697-701.
- Murray, P., & Wynn, TA. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 11:723-737.
- Nelson, A., Fingleton, B., Rothenberg, ML., & Matrisian, LM. (2000). Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. *J Clin Oncol*. 18:1135-1149.
- Neurath, M., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, PR., Bhan, A., Autschbach, F., Sullivan, BM., Szabo, SJ., Glimcher, LH., & Blumberg, RS. (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med*. 195 (9):1129-1143.
- Neutra, M., Sansonetti, PJ., & Kraehenbuhl, JP. (2003). *In microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell*: American Society for Microbiology Press, Washington DC.
- Ni, J., Chen, S-F., & Hollander, D. (1996). Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 39:234-241.
- Niu, G., Wright, KL., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, LM., Karras, J., Bromberg, J.,

- Pardoll, D., Jove, R., & Yu, H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000–2008.
- Okamoto, R., & Watanabe, M. . (2005). Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci.* 50(Suppl 1):S34–38.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694-702.
- Okayasu, I., Ohkusa, T., Kajiura, K., Kanno, J., & Sakamoto, S. (1996). Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut* 39:87-92.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, JC., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, JS., Moore, KW., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, JF., & Kastelein, RA. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715–725.
- Otsuka, O., Kang, YJ., Ren, J., Jiang, H., Wang, Y., Omata, M., & Han, J. (2010). Distinct effects of p38a deletion in myeloid lineage and gut epithelia in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 138:1255–1265.
- Parker, C., Hunt, J., Diener, K., McGinley, M., Soriano, B., Keesler, GA., Bary, J., Yao, Z., Wang, XS., Hohno, T., & Lichenstein, HS. (1998). Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta. *Biochem Biophys Res Commun.* 249 (3):791–796.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777–11789.
- Parks, W., Wilson, CL., & Lopez-Boado, YS. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4(8):617–629.
- Pestka, S., Krause, CD., Sarkar, D., Walter, MR., Shi, Y., & Fisher, PB. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 22:929–979.
- Peterson, C., Sangfelt, P., Wagner, M., Hansson, T., Lettesjo, H., & Carlson, M. (2007). Fecal levels of leukocyte markers reflect disease activity in patients with ulcerative colitis. *Scand J Clin Lab Invest.* 67:810-820.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., & Vermeire, S. (2006). Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 12(1):1–8.

- Plevy, S., Landers, C.J., Prehn, J., Carramanzana, N.M., Deem, R.L., Shealy, D., & Targan, S.R. (1997). A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol.* 159:6276-6282.
- Plevy, S. (2002). The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 31:77-92.
- Podolsky, D. (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 347 (6):417-429.
- Podolsky, D., Gerken, G., Eyking, A., & Cario, E. (2009). Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair due to TFF3 deficiency. *Gastroenterology* 137(1):209–220.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14:1837-1851.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 17:45–51.
- Popivanova, B., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C., & Mukaida, N. (2008). Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest.* 118:560 –570.
- Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M.G., Allavena, P., Mantovani, A., & Sica, A. (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214:761–777.
- Pozzi, A., Yan, X., Macias-Perez, I., Wei, S., Hata, A.N., Breyer, R.M., Morrow, J.D., & Capdevila, J.H. (2004). Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem.* 279:29797–29804.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., & Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogenactivated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 16:1247–1255.
- Rajagopalan, H., Nowak, M.A., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3:695-700.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-241.
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100–3112.

- Ramasundara, M., Leach, ST., Lemberg, DA., & Day, AS. (2009). Defensins and inflammation: The role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:202–208.
- Remy, G., Risco, AM., Iñesta-Vaquera, FA., González-Terán, B., Sabio, G., Davis, RJ., & Cuenda, A. (2009). Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cell Signal.* 22(4):660-667.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, JP., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2:361–367.
- Risco, A., & Cuenda, A. (2012). New insights into the p38 γ and p38 δ MAPK pathways. *J Signal Transduct.*
- Risco, A., del Fresno, C., Mamnol, A., Alsina-Beauchamp, D., MacKenzie, K., Yang, H-T., Barber, DF., Morcelle, C., Arthur, JS., Ley SC., Ardavin, C., & Cuenda, A. (2012). p38 γ and p38 δ kinases regulate TLR4-induced cytokine production by controlling ERK1/2 pathway activation. *PNAS.*
- Rizzo, A., Pallone, F., Monteleone, G., & Fantini, MC. (2011). Intestinal inflammation and colorectal cancer: A doubleedged sword? *World J Gastroenterol.* 17 (26):3092-3100.
- Roessner, A., Kuester, D., Malfertheiner, P., & Schneider-Stock, R. (2008). Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 204:511–524.
- Romashkova, J., & Makarov, SS. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401:86–90.
- Rosenstiel, P., Sina, C., Franke, A., & Schreiber, S. (2009). Towards a molecular risk map—Recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol.* 21:334–345.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., & Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78(6):1027-1037.
- Rousseau, S., Dolado, I., Beardmore, V., Shpiro, N., Marquez, R., Nebreda, AR., Arthur, JS., Case, LM., Tessier-Lavigne, M., Gaestel, M., Cuenda, A., & Cohen, P. (2006). CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38 α MAPK-MAPKAP-K2- HSP27 pathway. *Cell Signal.* 18:1897-1905.

- Roux, P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68 (2):320–344.
- Sabio, G., Reuver, S., Feijoo, C., Hasegawa, M., Thomas, GM., Centeno, F., Kuhlendahl, S., Leal-Ortiz, S., Goedert, M., Garner, C., & Cuenda, A. (2004). Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2. *Biochem J.* 380:19-30.
- Sabio, G., Arthur, JS., Kuma, Y., Pegg, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, NA., & Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J.* 24:1134-1145.
- Sabio, G., Cerezo-Guisado, MI., del Reino, P., Iñesta-Vaquera, FA., Rousseau, S., Arthur, JS., Campbell, DG., Centeno, F., & Cuenda, A. (2010). p38gamma regulates interaction of nuclear PSF and RNA with the tumour-suppressor hDlg in response to osmotic shock. *J Cell Sci.* 123:2596-2604.
- Sakabe, K., Teramoto, H., Zohar, M., Behbahani, B., Miyazaki, H., Chikumi, H., & Gutkind, JS. (2002). Potent transforming activity of the small GTPbinding protein Rit in NIH 3T3 cells: evidence for a role of a p38gammadependent signaling pathway. *FEBS Lett.* 511:15–20.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155:115–1164.
- Saleh, M., & Trinchieri, G. (2011). Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 11:9-20.
- Salim, S., & Söderholm, JD. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 17:362–381.
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:695-723.
- Sansonetti, P. (2004). War and peace at mucosal surfaces. . *Nat Rev Immunol.* 12:953-964.
- Sartor, R. (1994). Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106:533-539.
- Schiechl, G., Bauer, B., Fuss, I., Lang, SA., Moser, C., Ruemmele, P., Rose-John, S., Neurath, MF., Geissler, EK., Schlitt, HJ., Strober, W., & Fichtner-Feigl, S. (2011). Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88

- signaling of colonic F4/80+CD11b(high)Gr1(low) macrophages. *J Clin Invest.* 121 (5):1692-1708.
- Schindler, E., Hindes, A., Gribben, EL., Burns, CJ., Yin, Y., Lin, MH., Owen, RJ., Longmore, GD., Kissling, GE., Arthur, JS., & Efimova, T. (2009). p38 δ mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice. *Cancer Res.* 69 (11):4648-4655.
- Schmelter, M., Ateghang, B., Helmig, S., Wartenberg, M. & Sauer, H. (2006). Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J.* 20:1182–1184.
- Schneikert, J., & Behrens, J. (2007). The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut* 56:417-425.
- Schottelius, A., Mayo, MW., Sartor, RB., & Baldwin, AS. Jr. (1999). Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem.* 274:31868–31874.
- Schoultz, I., Söderholm, JD., & McKay, DM. (2011). Is metabolic stress a common denominator in inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis.* 17 (9):2008–2018.
- Schuppan, D., & Hann, EG. (2000). MMPs in the gut: inflammation hits the matrix. *Gut* 47:12-14.
- Seifert, W., Wobbes, T., & Hendriks, T. . (1996). Divergent patterns of matrix metalloproteinase activity during wound healing in ileum and colon of rats. *Gut* 39(1):114-119.
- Sheehan, K., Sheahan, K., O'Donoghue, DP., MacSweeney, F., Conroy, RM., Fitzgerald, DJ., & Murray, FE. (1999). The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 282:1254 –1257.
- Sheikh, S., & Plevy, SE. (2010). The role of the macrophage in sentinel responses in intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol.* 26 (6):578–582.
- Shields, J., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., & Der, CJ. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* 10:147-154.
- Shih, D., Targan, SR., & McGovern, D. (2008). Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep.* 10:568-575.
- Shuai, K., & Liu, B. (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 5:593–605.

- Sica, A., & Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest.* 117:1155–1166.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Portaa, C., Totaro, MG., Rimoldi, M., Biswas, SK., Allavena, P., & Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 18:349–355.
- Sica, A., Allavena, P., & Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett.* 264:204–215.
- Singh, J., Cruickshank, SM., Newton, DJ., Wakenshaw, L., Graham, A., Lan, J., Lodge, JP., Felsburg, PJ., & Carding, SR. (2005). Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288:G514–G524.
- Sobotta, W. (2010). Histología. In *Histología*. J.H. Negrete, editor: Editorial Médica Panamericana.
- Sohn, O., Fiala, ES., Requeijo, SP., Weisburger, JH., & Gonzalez, FJ. (2001). Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res.* 61:8435–8440.
- Staal, F., van Noort, M., Strous, GJ., & Clevers, HC. (2002). Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep.* 3 (1):63-68.
- Stein, B., Yang, MX., Young, DB., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, BW., & Barbosa, MS. (1997). p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem.* 272 (31):19509–19517.
- Sternlicht, M., Bissell, MJ., & Werb, ZT. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 19:1102–1113.
- Sternlicht, M., & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463–516.
- Sturm, A., & Dignass, AU. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 14(3):348-353.
- Suenaert, P., Maerten, P., Van Assche, G., Van Driessche, W., Geboes, K., Bulteel, V., Simaels, J., Augustijns, P., Ceuppens, JL., Rutgeerts, P., & Perrier, C. (2010). Effects of T cell-induced colonic inflammation on epithelial barrier function. *Inflamm Bowel Dis.* 16(8):1322-1331.
- Sumara, G., Formentini, I., Collins, S., Sumara, I., Windak, R., Bodenmiller, B., Ramracheya, R., Caille, D., Jiang, H., Platt, KA., Meda, P., Aebersold, R.,

- Rorsman, P., & Ricci, R. (2009). Regulation of PKD by the MAPK p38 δ in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136 (2):235–248.
- Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H., & Tanaka, T. (2006). Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 27(1):162-169.
- Swann, J., & Smyth, MJ. (2007). Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 117:1137–1146.
- Takahashi, M., & Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95 (6):475-480.
- Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, WE., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, JS., & Raab-Traub, N. (1999). Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol.* 73:5548–5555.
- Taketo, M. (2006). Wnt signaling and gastrointestinal tumorigenesis in mouse models. *Oncogene* 25:7522–7530.
- Tamaoki, N. (2001). The rasH2 transgenic mouse: nature of the model and mechanistic studies on tumorigenesis. *Toxicol Pathol.* 29(Suppl.):81–89.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94 (11):965-973.
- Tang, J., Qi, X., Mercola, D., Han, J., & Chen, G. (2005). Essential role of p38gamma in K-Ras transformation independent of phosphorylation. *J Biol Chem.* 280 (25):23910-23917.
- Tang, Y., Katuri, V., Srinivasan, R., Fogt, F., Redman, R., Anand, G., Said, A., Fishbein, T., Zasloff, M., Reddy, EP., Mishra, B., & Mishra, L. (2005). Transforming growth factor-beta suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res.* 65:4228 – 4237.
- Tato, C.H., CA. . (2002). Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF- κ B pathway during infection. *Infect Immun.* 70:3311-3317.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138:2101-2114.
- Tessner, T., Muhale, F., Riehl, TE., Anant, S., & Stenson, WF. (2004). Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism

- involving AKT activation and bax translocation. *J Clin Invest.* 114:1676 – 1685.
- Thornton, T., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, CD., Aronshtam, A., Clements, JL., Sabio, G., Davis, RJ., Matthews, DE., Doble, B., & Rincon, M. (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation. *Science* 320:667-670.
- Thornton, T., & Rincon, M. . (2009). Non-classical p38 MAP kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci.* 5:44–51.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., & DuBois, RN. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93:705–716.
- Tytgat, K., van der Wal, JW., Einerhand, AW., Büller, HA., & Dekker, J. (1996). Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 224 (2):397-405.
- Ventura, J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., & Nebreda, AR. (2007). p38 α MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 39:750–758.
- von Lampe, B., Barthel, B., Coupland, SE., Riecken, EO., & Rosewicz, S. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47:63–73.
- Wagner, E., & Nebreda, AR. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9:537-549.
- Waldner, M., & Neurath, MF. . (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol.* 31:249–256
- Wang, D., & DuBois, RN. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29:781-788.
- Wang, S., Liu, Z., Wang, L., & Zhang, X. . (2009). NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol.* 6:327-234.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D., & Yu, H. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 10:48–54.
- Wei, D., Le, X., Zheng, L., Wang, L., Frey, JA., Gao, AC., Peng, Z., Huang, S., Xiong, HQ., Abbruzzese, JL., & Xie, K. (2003). Stat3 activation regulates the

expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 22:319–329.

- Wilson, C., McIntyre, RE., Arends, MJ, & Adams, DJ. (2010). The activating mutation R201C in GNAS promotes intestinal tumourigenesis in Apc(Min/+) mice through activation of Wnt and ERK1/2 MAPK pathways. *Oncogene* 29:4567-4575.
- Woodruff, S., Masterson, JC., Fillon, S., Robinson, ZD., & Furuta, GT. (2011). Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *JPGN* 52 (6):650-661.
- Xavier, R., & Podolsky, DK. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427-434.
- Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S., Gritsko, T., Turkson, J., Kay, H., Semenza, GL., Cheng, JQ., Jove, R., & Yu, H. (2005). Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 24:5552–5560.
- Xu, X., Fu, XY., Plate, J., & Chong, AS. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression:.. *Cancer Res.* 58:2832-2837.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., & Matsumoto, K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270:2008–20011.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, SV., & Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE* 4 (6).
- Yoshida, H., & Goedert, M. (2006). Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38 δ or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *J Neurochem.* 99 (1):154-164.
- Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 7:41-51.
- Yu, H.J., R. . (2004). The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4:97–105.
- Zaki, M., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T-D. (2011). The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends in Immunology* 32 (4):171-179.

- Zhang, S., Han, J., Sells, MA., Chernoff, J., Knaus, UG., Ulevitch, RJ., & Bokoch, GM. (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem.* 270:23934–23936.
- Zheng, T., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, DW., Lazebnik, Y., & Flavell, RA. (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med.* 6 (11):1241-1247.
- Zumbrunn, J., Cuenda, A., & Näthke, IS. (2000). The adenomatous polyposis coli protein in cytoskeletal organization and cell signalling. *Cell and development biology: BSCB/BSDB joint spring meeting. University of Warwick (UK).*